

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PROTEÓMICA CARDIOVASCULAR: ANÁLISIS
PROTEÓMICO DE PLASMA Y MONOCITOS
CIRCULANTES HUMANOS EN PACIENTES CON
SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Verónica Moral Dardé

Bajo la dirección de los doctores
Fernando Vivanco
José Tuñón

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-0132-9**

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

PROTEÓMICA CARDIOVASCULAR:
ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PLASMA Y
MONOCITOS CIRCULANTES HUMANOS EN
PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO
AGUDO

TESIS DOCTORAL

Verónica Moral Dardé
Madrid, 2007

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular



PROTEÓMICA CARDIOVASCULAR:
ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PLASMA Y
MONOCITOS CIRCULANTES HUMANOS EN
PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO
AGUDO

TESIS DOCTORAL

Verónica Moral Dardé

Madrid, 2007

Directores:

Dr. Fernando Vivanco y Dr. José Tuñón

Nada es veneno, todo es veneno: la diferencia está en la dosis
Theophrastus Bombart von Hohenheim (Paracelso)

Una cosa es saber y otra saber enseñar
Marco Tulio Cicerón

Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas.
Louis Pasteur

La travesía de mil millas comienza con un paso
Lao-Tse

A mis padres y a mis abuelos
A mi hermano
A Félix

Agradecimientos

Quisiera mostrar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, comenzando por la Fundación Jiénez Díaz y la Fundación Conchita Rábago, mis directores de Tesis, el Dr. Fernando Vivanco y el Dr. José Tuñón y a mis compañeros, en especial a la Dra. M^a Eugenia González Barderas, por su inestimable apoyo y la gran cantidad de tiempo dedicado a este trabajo; al Dr. Julio Gallego, por sus consejos sobre el diseño experimental y el análisis de los datos; y al Dr. Alberto Lázaro, por su generosidad al proporcionarme el primer modelo en el que basarme para comenzar a redactar esta Tesis.

También tengo que dar las gracias a la Dra. Patricia Alfonso (CNIO), cuya colaboración fue trascendental para la realización de mis primeros experimentos de electroforesis bidimensional diferencial. Del mismo modo, me gustaría expresar mi gratitud al Dr. Juan Antonio López, a D. Emilio Camafeita y a D. Enrique Calvo de la Unidad de Proteómica de la Fundación CNIC, por proporcionarme una buena base de conocimientos en mis inicios sobre muchas de las técnicas habitualmente empleadas en proteómica, por resolverme gran cantidad de dudas a lo largo de estos años y por muchas otras cosas. Y a las chicas de la Unidad de Proteómica de la UCM/PCM, en particular a la Dra. Montserrat Martínez Gomariz, por prestarme su tiempo y su paciencia, tantas y tantas veces, con los experimentos de electroforesis bidimensional diferencial y con las primeras versiones del manuscrito. Muchas gracias por todo.

Agradecer también el afecto recibido por todos los grandes amigos sin cuyo aliento nunca habría llegado hasta aquí. Algunos de ellos están en la FJD, o han pasado por aquí en algún momento y han aportado su granito de arena para hacer de un lugar de trabajo un sitio más entrañable. Otros, más antiguos, con su cariño desde la distancia, que siempre están allí cuando los necesito. Gracias por tantas cosas que aquí no caben...

A mi familia, que son el pilar fundamental en que se asientan las bases de esta Tesis, porque fueron ellos los que me enseñaron que el trabajo duro es lo que nos lleva a alcanzar las metas que nos proponemos. Mis abuelos (los cinco), que para mi fortuna me han transmitido una parte de su gran sabiduría e inmensas cantidades de cariño. A mis tíos, en especial a mi tío Juanjo, por representar en muchas cosas un modelo a seguir. A mis primos (incluyendo a los primos grandes), por haber compartido tantos

buenos y malos momentos, y porque siempre estáis ahí. A mi familia del 1°C, porque ningún árbol genealógico recoge este tipo de parentesco, que es muchas veces más importante que los lazos de sangre. A mi hermano, que pasó de ser un cascabel a convertirse en una persona seria y madura, pero con un corazón que no le cabe en el pecho. Y, sobre todo, a mis padres. Creo que nunca podré transmitirlos toda la admiración y el respeto que os tengo, nunca sabré corresponder todo vuestro amor, vuestro apoyo incondicional y vuestra fe en mí a lo largo de toda mi vida. Habéis puesto el listón muy alto para todo futuro proyecto de familia, porque no se me ocurre una educación mejor que la que Rubén y yo hemos recibido. Querría deciros muchas más cosas, pero no soy capaz de resumirlo, así que sencillamente, muchas gracias por todo. Os quiero.

Por último, si mi familia ha sido el pilar de esta Tesis, los muros de carga, las paredes, las ventanas, las puertas y el techo has sido tú, Félix. Has sido tú quien ha estado ahí, día tras día, dándome las fuerzas para seguir adelante, especialmente en los momentos más difíciles (y tú bien sabes que han sido unos cuantos). Gracias por ser la inspiración, el calor y la fuerza que me han mantenido en pie todos estos años. Es imposible que te compense todo lo que me has aportado, así que solo espero que podamos seguir el camino adelante para intentarlo cada nuevo día.

Índice

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
A) ENFERMEDAD CORONARIA	6
1. <i>Aterosclerosis</i>	6
1.1. Disfunción Endotelial	7
1.2. Aterogénesis	8
1.3. Ruptura y trombosis de la placa de ateroma	8
2. <i>Síndrome Coronario Agudo</i>	9
2.1. Manifestación clínica	10
2.2. Tratamiento y prevención	10
2.3. Perspectivas	12
B) PROTEÓMICA	14
1. <i>Métodos de separación de proteínas</i>	14
1.1. Cromatografía líquida	15
1.2. Electroforesis bidimensional	15
2. <i>Espectrometría de masas</i>	16
2.1. Espectrómetros de masas	16
2.2. Identificación de proteínas	18
3. <i>Aplicaciones del análisis proteómico</i>	19
3.1. Análisis de expresión diferencial mediante 2-DE y MALDI-TOF	20
4. <i>Antecedentes en proteómica cardiovascular</i>	24
4.1. Análisis proteómico de la placa de ateroma	24
4.2. Análisis proteómico de las células que constituyen la placa de ateroma	25
4.3. Análisis proteómico de los elementos de la sangre en pacientes con SCA	27
4.4. Nuevas fuentes de biomarcadores: Monocitos circulantes	28
4.5. La complejidad del proteoma del plasma	29
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. <i>Selección de pacientes y obtención de las muestras</i>	35
2. <i>Aislamiento de monocitos</i>	37
3. <i>Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma</i>	38
4. <i>Electroforesis bidimensional</i>	40
4.1. 1ª dimensión: Isoelectroenfoque	40
4.2. Equilibrado	42
4.3. 2ª dimensión: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	42
5. <i>Tinción con plata y captura de las imágenes</i>	43
6. <i>Tinción con Azul de Coomassie</i>	44
6.1. Tinción “clásica”	44
6.2. Tinción con Coomassie coloidal	44
7. <i>Electroforesis bidimensional diferencial (DIGE)</i>	45
7.1. Marcaje de las muestras	45
7.2. Electroforesis bidimensional	46
7.3. Captura de imágenes	46
8. <i>Análisis de las imágenes</i>	47
8.1. Geles teñidos con plata	47
8.2. Geles 2D-DIGE	49
9. <i>Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas</i>	56
9.1. Preparación de las muestras: Digestión triptica “en gel”	56
9.2. Análisis de las muestras mediante Espectrometría de Masas (MS)	57
10. <i>Validación de los resultados: Inmunodetección</i>	59
10.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE unidimensional)	59
10.2. Electroforesis bidimensional	59
10.3. Transferencia a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección indirecta	60

RESULTADOS	63
A) MONOCITOS	63
1. <i>Análisis comparativo de los geles bidimensionales</i>	63
1.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional)	64
1.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina)	66
2. <i>Identificación de proteínas</i>	67
2.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional)	68
2.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina)	70
2.3. Clasificación funcional de las proteínas identificadas	72
3. <i>Validación de los resultados mediante inmunodetección</i>	74
B) PLASMA	76
1. <i>Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma</i>	76
2. <i>Electroforesis bidimensional (2-DE) del plasma</i>	77
3. <i>Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) del plasma</i>	78
4. <i>Análisis comparativo de los geles bidimensionales</i>	80
4.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional)	81
4.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina)	98
5. <i>Identificación de proteínas</i>	108
5.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional) mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE)	109
5.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional) mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)	113
5.3. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina) mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE)	117
5.4. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina) mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)	119
5.5. Clasificación funcional de las proteínas identificadas	120
6. <i>Validación de los resultados mediante inmunodetección</i>	123
DISCUSIÓN	127
A) MONOCITOS	128
B) PLASMA	137
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	163
ANEXO	183

Abreviaturas

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial
2-DE	Electroforesis bidimensional
A	Ausente
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
AI	Angina Inestable
AMBP	Proteína precursora de la α_1 -Microglobulina y Bikunina
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
ApoA-IV	Apolipoproteína A-IV
ApoE	Apolipoproteína E
ApoJ	Apolipoproteína J
APS	Persulfato amónico
ARDS	Síndrome de Distrés Respiratorio en Adultos
ATV	Atorvastatina
BVA	Análisis de variaciones biológicas
C.S.	Cobertura de secuencia
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato]
CID	Fragmentación inducida por colisión
CID	Disociación inducida por colisión
CK-MB	Isoforma de la enzima Creatinquinasa específica de miocardio
CoA	Coenzima A
DIA	Análisis de diferencias dentro del gel
DTT	Ditiotreitol
E	Estables
ECG	Electrocardiograma
ECL	Quimioluminiscencia acentuada
EDA	Análisis de datos extendido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrómetro de masas
ESI	Electronebulización o electrospray
h.	horas
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRBP	Proteína humana de unión a Retinol
HSC70	Proteína-conato de choque térmico de 71 kDa
HSP27	Proteína de choque térmico de 27kDa
HSP60	Proteína de choque térmico de 60kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70kDa
HUPO	“Human Proteome Organisation” (Consorcio del Proteoma Humano)
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICAT	Etiqueta de afinidad codificada por isótopo
iECA	Inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina
IEF	Isoelectroenfoque
IgA	Inmunoglobulina A

Abreviaturas

IgG	Inmunoglobulina G
IMS	Imagen por espectrometría de masas
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
IT	Trampa iónica
iTRAQ	Etiqueta isotópica para cuantificación relativa y absoluta
LC	Cromatografía líquida
LCAT	Lecitín Acil Coolesterol Transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LTQ-FT-ICR	Trampa lineal-Resonancia iónica ciclotrón transformada de Fourier
m/z	Masa /Carga
MALDI	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
MCP-1	Proteína quimiotáctica 1 de monocitos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
min.	minutos
MM	Masa molecular
MMP	Metaloproteinasa
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
MudPIT	Tecnología multidimensional de identificación de proteínas
N	Normalizado
NL	No lineal
oxLDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
p/v	Peso / Volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PDA	Piperazina diacrilamida
PDI	Proteína Disulfuro-isomerasa ER60
PEDF	Factor derivado del Pigmento de Epitelio
PMF	Huella dactilar peptídica
PN	Parcialmente normalizado
PON I	Paraoxonasa I
ppp	Puntos por pulgada
Q	Cuadrapolo
S	Sanos
SAA	Proteína Amiloide A del suero
SAP	Componente P Amiloide del Suero
SCA	Síndrome Coronario Agudo
SDS	Dodecil sulfato sódico
SELDI	Desorción/ionización mediante láser realizada por superficie
SOM	Mapas auto-organizativos
SOM	Mapas auto-organizativos
TEMED	N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tiempo de vuelo
TPM4	Tropomiosina 4
Tris	2-amino-2-hydroximetil-1,3-propanodiol
V	Voltios
v/v	Volumen / Volumen
VDBP	Proteína de unión a Vitamina D

Introducción

Todas las cosas ya fueron dichas, pero como nadie
escucha es preciso comenzar de nuevo.

André Gide

Los síndromes coronarios agudos (SCA), como el infarto agudo de miocardio y la angina inestable, son los principales responsables de la mortalidad por cardiopatía isquémica, de manera directa o indirecta. Estos síndromes se deben a la oclusión de una arteria coronaria por la formación de un trombo, cuya causa más frecuente es la aparición de una fisura en la cápsula fibrosa de las lesiones ateroscleróticas [1-5], lo que permite la puesta en contacto de su núcleo lipídico (altamente trombogénico) con la sangre [6]. El estudio de los mecanismos que llevan a la trombosis de la placa ha sido uno de los temas clave en la investigación cardiovascular, lo que ha implicado un gran avance en este área en los últimos tiempos. Así, se ha establecido una clara relación entre la presencia de actividad inflamatoria en las placas y la aparición de SCA [7, 8]. Sin embargo, a pesar de los avances logrados hasta la fecha, seguimos sin conocer en profundidad la fisiopatología de una enfermedad que es la causa principal de mortandad en los países occidentales [9], siendo la causante del 21,6% de todas las muertes en nuestro país en 1999 [10]. Se trata por tanto de un problema de gran repercusión socioeconómica debido a que puede causar la muerte, o dejar graves secuelas en los individuos que la padecen, estando aún en edad laboral un porcentaje significativo de los mismos. A esto hay que sumar los elevados costes sanitarios (medicamentos, hospitalizaciones y tratamientos quirúrgicos) para tratar la enfermedad [10]. Por todo ello, la identificación temprana de pacientes con riesgo de desarrollar un SCA sería de gran importancia ya que podría disminuir la mortalidad y morbilidad asociada a esta enfermedad.

A) ENFERMEDAD CORONARIA

Para poder desempeñar su función correctamente, el músculo cardíaco necesita un aporte continuo de oxígeno, que consigue a través de las arterias coronarias. La enfermedad coronaria implica un estrechamiento de estas arterias causado por la formación de las placas de ateroma, unos depósitos de naturaleza lipídica que provocan el engrosamiento y endurecimiento de la pared vascular (figura I_01) [11]. La acumulación de estos depósitos lipídicos es una patología vascular, normalmente asociada a la edad, conocida como Aterosclerosis. En determinadas circunstancias, la placa de ateroma puede debilitarse y llegar a romperse, lo que origina la formación de un trombo que puede llegar a bloquear la luz arterial, provocando una isquemia que es la causa de los SCA.

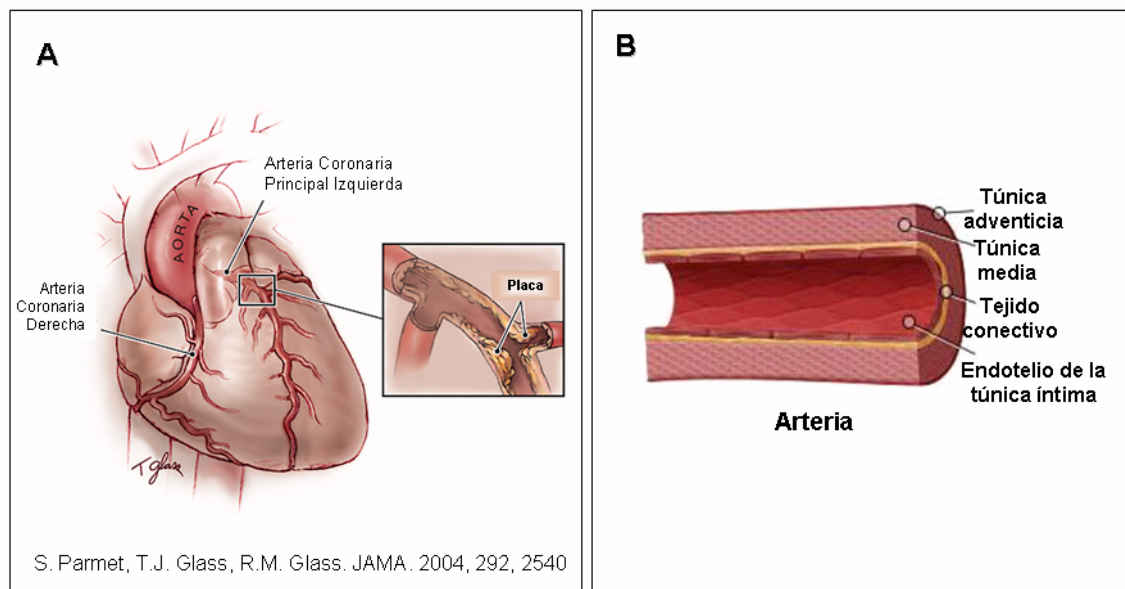


Figura I_01: (A) Representación del corazón humano con las arterias coronarias. El detalle muestra la presencia de una placa de ateroma en la arteria coronaria izquierda. (B) Estructura de la de la arteria sana.

1. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica en la que tiene lugar un incremento del grosor de la pared de las arterias que disminuye la elasticidad de los vasos. Este engrosamiento es el resultado del depósito en la pared arterial de lípidos y otras sustancias que desencadenan una reacción inflamatoria con formación de tejido conjuntivo [12], causando la lesión del endotelio vascular y la formación de la placa de ateroma (figura I_02) [13]. Existen múltiples factores (hipertensión, diabetes mellitus, hiperlipidemia, tabaquismo, etc.) que pueden causar el daño endotelial. Este daño conlleva habitualmente la infiltración de células inflamatorias en la pared vascular con

proliferación celular, formación de la placa fibrosa y, en última instancia, ruptura de la placa y trombosis oclusiva, lo que origina las manifestaciones clínicas de la enfermedad (SCA, angina inestable, ictus, etc).

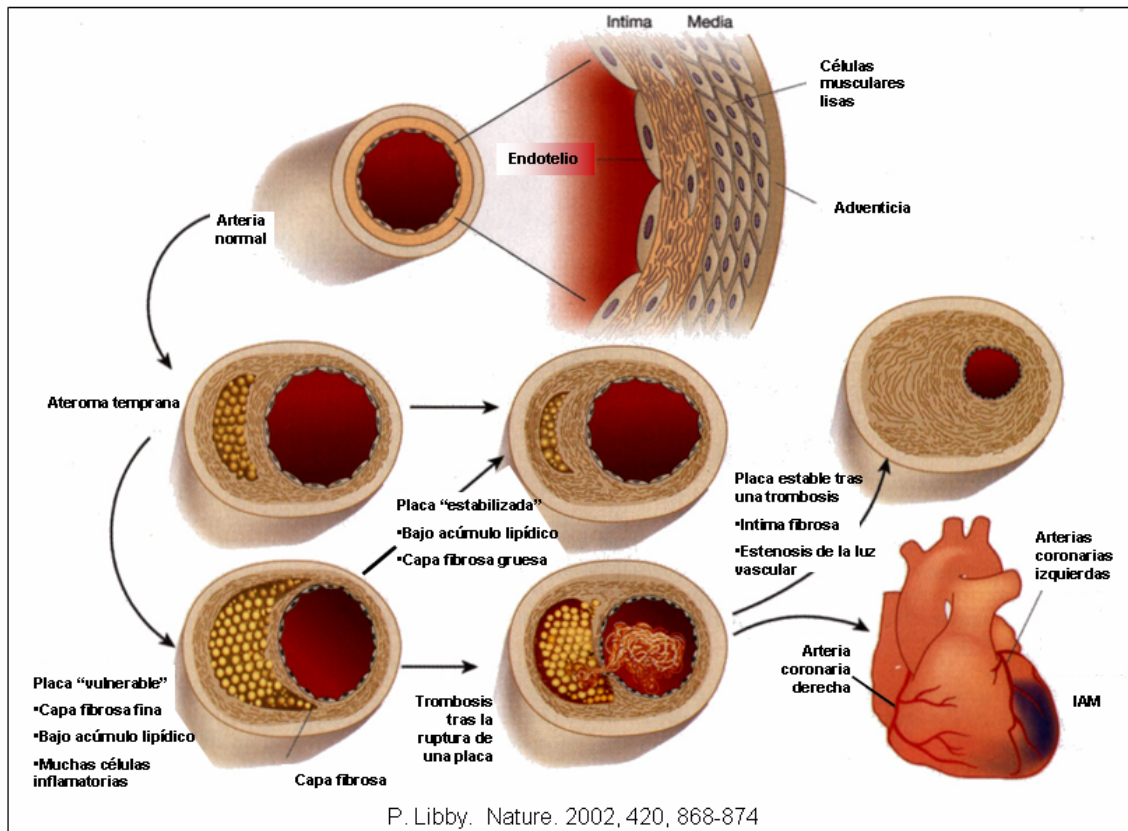


Figura I_02: Esquema del proceso de formación y desarrollo de la placa de ateroma, desde las primeras etapas, la posibilidad de estabilización o desestabilización y, en este último caso, la trombosis. IAM, Infarto Agudo de Miocardio.

1.1. Disfunción Endotelial

A lo largo de la vida de un individuo, el endotelio puede verse afectado por diferentes estímulos, tales como hipoxia, exposición a citoquinas, endotoxinas, colesterol, estrés hemodinámico, etc. [14]. En respuesta a esos estímulos las células endoteliales se activan, potenciando la vasoconstricción, la coagulación, la adhesión de leucocitos y la proliferación de células musculares lisas. Aunque generalmente son mecanismos protectores, estas respuestas pueden llegar a ser excesivas ante estímulos severos, conduciendo a lo que se conoce como estado disfuncional o disfunción endotelial. Se trata de un estado particular de activación endotelial, que se caracteriza por un proceso proinflamatorio, proliferativo y procoagulante que favorece la aterogénesis [15]. Aunque no está claro si la disfunción endotelial es causa o consecuencia de la aterosclerosis, se ha observado que precede a los cambios morfológicos iniciales en este proceso y que desempeña un papel importante en la

formación y crecimiento de las lesiones ateroscleróticas, al igual que en el desarrollo de la isquemia y trombosis en las últimas etapas de la enfermedad [16].

1.2. Aterogénesis

En el proceso de formación de la placa de ateroma, la disfunción endotelial y el depósito de lípidos en la pared vascular actúan como estímulos desencadenantes de una reacción que conduce a la formación de una cápsula fibrosa alrededor del núcleo lipídico central. Actualmente se acepta que la aterogénesis es una respuesta inflamatoria a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se han depositado en el subendotelio y a la presencia de otros factores de riesgo coronario [12, 17]. Aunque en inicio se trata de un mecanismo de defensa del endotelio, finalmente contribuye a la generación y el desarrollo de la lesión ateromatosa. La presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) en el espacio subendotelial induce en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión y de mediadores quimiotácticos capaces de atraer diversas células inflamatorias [18]. Los monocitos circulantes, atraídos por estas proteínas quimiotácticas, abandonan el espacio vascular, se unen a las células endoteliales y migran a la íntima donde se diferencian a macrófagos (figura I_06) [13], en respuesta al factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). A continuación los macrófagos se cargan de lípidos, transformándose en células espumosas, asociadas a la aparición de las estrías grasas [19-21]. Finalmente, la lesión progresa con la participación de otras células, particularmente las musculares lisas, que segregan diversos componentes de la matriz extracelular para formar una cubierta fibrosa sobre el núcleo lipídico, más o menos vulnerable a la rotura [17], conocida como placa de ateroma.

1.3. Ruptura y trombosis de la placa de ateroma.

Tras la formación de la placa, la aparición de nuevos daños estructurales del endotelio podría provocar la erosión endotelial, causando una complicación de la placa que suele derivar en trombosis. La obstrucción de la arteria, dará lugar a necrosis de las células del órgano afectado. En el caso del cerebro, esto se expresa como accidente cerebro-vascular (infarto cerebral) que puede ocasionar la muerte del sujeto o dejarle con severa discapacidad física. Cuando la oclusión arterial afecta a las extremidades inferiores, dará lugar a una necrosis del tejido muscular. Por último, en el caso del corazón dará lugar a un síndrome coronario agudo (SCA) [22], cuya gravedad

dependerá del grado de obstrucción del vaso (angina inestable, infarto agudo de miocardio o muerte súbita).

La causa más frecuente de la complicación de la placa de ateroma es la aparición de una fisura o incluso de una rotura en la cápsula fibrosa, ya que pone en contacto la sangre con su núcleo lipídico que es rico en factor tisular (proteína que activa la vía extrínseca de la cascada de la coagulación). De este modo se desencadenará la trombosis [7], favorecida por la disfunción del endotelio vascular [23] que habrá perdido su capacidad antitrombótica.

En los últimos años se ha demostrado que la inflamación juega un papel esencial en la rotura de la placa [7]. Así, se ha observado que las placas inestables presentan infiltración de macrófagos, linfocitos T y células musculares lisas activadas con mucha mayor frecuencia que las estables [7, 12]. La hipótesis más aceptada es que los macrófagos (derivados de monocitos circulantes) degradarían la matriz extracelular de la cápsula fibrosa por fagocitosis o secreción de enzimas proteolíticas (metaloproteinasas), debilitando la cubierta de la placa de ateroma. De hecho, se han identificado estas enzimas en placas ateroscleróticas humanas [24]. Por otra parte, se ha sugerido que la apoptosis podría también favorecer la trombosis, ya que afectaría a los macrófagos de la placa, provocando la liberación de las metaloproteinasas y del factor tisular [25] y también a las células musculares lisas, responsables de la síntesis de proteínas de matriz extracelular que confieren resistencia a la cápsula [26]. Todo ello en conjunto debilitaría aún más la placa y podría desencadenar su ruptura por las fuerzas hemodinámicas a que está sometida [8, 27-29].

Está bien establecido en la literatura que existe una serie de factores de riesgo que favorecen la rotura de la placa y la aparición de los SCA, entre los que se encuentran la elevación de los niveles plasmáticos del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL), el descenso de los niveles plasmáticos del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), el tabaquismo, la hipertensión y la hiperglucemia [30].

2. Síndrome Coronario Agudo

El síndrome coronario agudo (SCA) es un conjunto de manifestaciones de cardiopatía isquémica o insuficiencia coronaria, que tienen como causa común la disminución del aporte de sangre al miocardio como consecuencia de la obstrucción

parcial o total de las arterias coronarias, generalmente causada por placas de ateroma (por si mismas o por la trombosis provocada por su rotura) [3, 7]. Comprende tres grupos de afecciones: angina de pecho inestable, cuando la isquemia no llega a provocar necrosis en el tejido miocárdico; el infarto agudo de miocardio, cuando la isquemia produce necrosis en una porción del miocardio; y la muerte súbita, cuando los impulsos eléctricos del corazón se alteran (taquicardia y/o fibrilación ventricular) provocando el paro cardíaco.

2.1. Manifestación clínica.

La presentación clínica de los diferentes SCA depende de la extensión y duración de la isquemia provocada por la obstrucción del flujo coronario, lo que se refleja en el electrocardiograma (ECG) y permite clasificarlos en SCA con o sin elevación del segmento ST. La elevación del segmento ST del ECG indica que se trata de un infarto agudo de miocardio (IAM), mientras que el segmento ST sin elevación puede deberse a un IAM o bien angina inestable (AI) [31, 32]. Además, la aparición de ondas Q anormales puede considerarse un signo de necrosis miocárdica. Un trombo no oclusivo o transitoriamente oclusivo es la causa más frecuente de la AI o del IAM sin elevación del segmento ST (también llamado IAM no Q). En la AI la oclusión temporal no suele durar más de 20 minutos y produce angina de reposo. En el IAM no Q la interrupción dura más tiempo, aunque el miocardio puede estar protegido por circulación colateral desde otros vasos, lo que reduce la isquemia y la necrosis del tejido miocárdico. En el IAM con elevación del segmento ST el trombo es oclusivo sin circulación colateral, la duración de la isquemia es más prolongada y el alcance de la necrosis es mayor [31, 32]. En los casos de SCA sin elevación del segmento ST, es necesario averiguar si se ha producido necrosis del tejido miocárdico para determinar si se trata de un IAM o una AI. Para ello se realiza la determinación de los niveles séricos de troponinas y de la CK-MB (isoforma de la enzima Creatinquinasa específica de miocardio), dos marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica, cuya presencia indica que se trata de un IAM [31].

2.2. Tratamiento y prevención.

Cuando un paciente ingresa con un cuadro de dolor torácico opresivo, intenso y persistente, el objetivo inicial es clasificarlo en forma exacta, rápida y eficiente [33]. Por ello es necesario realizar el ECG en los 5-10 primeros minutos de la llegada a urgencias y los análisis bioquímicos a la mayor brevedad, para poder establecer el tratamiento apropiado en el menor tiempo posible, ya que las terapias de reperfusión tienen mayor

éxito cuando se realizan durante la primera hora de evolución del infarto. Se considera terapia de reperfusión toda aquella maniobra dirigida a restablecer el flujo coronario. En la actualidad, se puede realizar mediante métodos farmacológicos (trombolisis farmacológica) o métodos quirúrgicos (angioplastia coronaria transluminal percutánea) [34].

Tras el episodio de IAM, el objetivo principal es que no se repita ningún evento isquémico en el miocardio. El tratamiento a largo plazo va dirigido a prevenir posibles recidivas y las complicaciones que puedan surgir con el tiempo, para lo cual se utilizan diferentes tipos de fármacos [35]. Los más clásicos y de probada eficacia son los antiagregantes plaquetarios (aspirina) [36, 37] y los agentes β -bloqueantes [38, 39] que actúan inhibiendo la unión de las catecolaminas a sus receptores, lo que les confiere propiedades anti-hipertensivas, anti-isquémicas, anti-arritmicas, etc. Otros fármacos de aplicación más reciente son los inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (iECA) y los hipolipemiantes o estatinas. Los iECAs son una familia de fármacos antihipertensivos que bloquean la conversión de Angiotensina I a Angiotensina II, capaces de ejercer además un efecto favorable en la remodelación ventricular que suele ir acompañada de una disminución de la mortalidad por fallo cardíaco congestivo [40, 41]. Por su parte, la eficacia de las estatinas (inhibidores de la Hidroximetilglutaril-CoA reductasa) en la prevención secundaria de la enfermedad coronaria y otras formas de aterosclerosis está bien establecida desde la publicación del estudio 4S [42-44]. Sin embargo, el momento de iniciar el tratamiento con estos agentes, así como el uso de dosis intensivas o moderadas de estatinas, siguen siendo investigados [45, 46]. El estudio PROVE-IT demostró recientemente que el tratamiento intensivo con 80mg/d de Atorvastatina era superior a la terapia moderada con 40 mg/d de Pravastatina, en términos de reducción de eventos cardiovasculares después de un SCA [47]. El estudio REVERSAL confirmó que el tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d, es capaz de retrasar la progresión de la aterosclerosis coronaria [45] y el estudio SPARCL ha demostrado que el tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d podría disminuir también la recurrencia de los accidentes cerebrovasculares [48].

Además del tratamiento a largo plazo, es necesaria una prevención secundaria mediante el control o la eliminación de los factores de riesgo conocidos de enfermedad coronaria (aumento del colesterol LDL, hiperglucemia, tabaquismo, etc.), para evitar la aparición de nuevos eventos coronarios agudos.

2.3. Perspectivas.

Aunque el estudio de la aterotrombosis ha sido uno de los temas clave de la investigación cardiovascular en la última década, actualmente seguimos siendo incapaces de predecir los SCA. Así, pese a que el tratamiento de este tipo de patología está muy avanzado hoy en día en el mundo occidental, se estima que hasta un 40% de los casos pueden fallecer antes de recibir atención hospitalaria. Por ello, la capacidad para predecir la enfermedad es en la actualidad uno de los retos de la investigación cardiovascular, que trata de encontrar nuevos biomarcadores [49]. Generalmente, el término “biomarcador” se identifica con la medida de los niveles plasmáticos de una molécula, proteína o enzima que proporciona valores pronósticos o diagnósticos reflejando una condición o estado patológico subyacente [50, 51]. Sin embargo, según la definición propuesta en 2001, un biomarcador es “una característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas” [52]. Esta definición implica que un marcador puede ser medido en una muestra biológica (sangre, orina, etc.), puede ser registrado en un paciente (ECG, etc.), o puede ser una prueba de imagen (ecocardiograma, etc.) [53]. El descubrimiento de nuevos biomarcadores de aterotrombosis es un gran desafío, al que se ha destinado mucho tiempo y esfuerzo, existiendo buenas perspectivas para los próximos años gracias a los avances en las técnicas de imagen (resonancia magnética y TAC multicorte). No obstante, la visualización de la pared vascular no va a predecir por sí sola la posibilidad de trombosis. Todo esto ha generado un interés creciente en el estudio de la sangre, incluyendo los elementos que van a constituir el trombo (plaquetas y fibrina) y los que nos puedan dar información sobre lo que ocurre en la pared vascular, teniendo en cuenta tanto las moléculas intercambiadas entre ambas estructuras como las células circulantes que se incorporan al interior de la pared vascular [54].

En la actualidad existen muy pocos marcadores bioquímicos usados en el seguimiento del SCA, fundamentalmente las ya mencionadas troponinas y CK-MB [31]. No obstante, su valor pronóstico es reducido ya que su elevación se debe a la necrosis miocárdica, por lo que son indicadoras de la consecuencia del evento coronario, pero no de los fenómenos que tienen lugar en la pared vascular y en la sangre. Por otra parte, existen en la literatura trabajos en los que se describen alteraciones en los niveles de algunas proteínas plasmáticas relacionadas con la

actividad inflamatoria en correlación con eventos coronarios agudos. Por ejemplo, los niveles de la proteína C reactiva, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), algunas moléculas de adhesión, varias metaloproteinasas, ligando de CD40 (CD40L) y la actividad de NF- κ B en leucocitos circulantes se ven incrementados en los pacientes con SCA. Es más, se ha propuesto que los niveles de varias de estas moléculas podrían predecir la aparición de un evento coronario agudo [55-60]. Sin embargo, por el momento ninguno de estos marcadores se utilizan en la práctica clínica habitual, ya que la información disponible en la actualidad es aún insuficiente. Tan solo se ha profundizado en el estudio de la proteína C reactiva, pero uno de los trabajos más recientes ha definido su capacidad pronóstica como limitada [61].

A pesar de todos los avances mencionados, seguimos siendo incapaces de predecir qué sujetos van a sufrir un SCA, lo que contribuye a la elevada mortalidad asociada a esta patología ya que, como se indicó anteriormente, muchos pacientes mueren antes de llegar al hospital. Por lo tanto, urge la necesidad de identificar nuevos biomarcadores específicos que puedan ser utilizados en la detección temprana de la enfermedad, incluso antes de que aparezcan sus manifestaciones clínicas. Por ello, el estudio global de las proteínas implicadas en la trombosis de la placa [62-64] y la búsqueda de biomarcadores en la sangre de los pacientes con SCA [20, 21, 65-68] son dos estrategias interesantes que podrían servir para profundizar en el conocimiento de esta patología y mejorar los actuales métodos de diagnóstico y tratamiento [49]. La proteómica es una tecnología especialmente adecuada para buscar nuevos candidatos a biomarcadores, ya que permite el estudio de las proteínas totales presentes en una muestra biológica. Su aplicación en este campo está permitiendo el desarrollo de nuevas herramientas en el pronóstico y diagnóstico cardiovascular [69].

La sangre es una muestra de fácil obtención y manipulación, lo que la convierte en la más importante desde el punto de vista clínico y posiblemente en la más apropiada para la búsqueda de biomarcadores. El plasma ha sido tradicionalmente el elemento de la sangre más estudiado, ya que su constante perfusión por todo el cuerpo le permite recoger información sobre el estado fisiológico de las diferentes partes del organismo [49], utilizándose de forma rutinaria en la práctica clínica [70]. Sin embargo, la búsqueda de biomarcadores en plasma mediante una aproximación proteómica es una tarea muy complicada, raramente empleada en proteómica clínica en sus inicios, debido a que su proteoma es probablemente el más complejo del cuerpo humano [70]. Por ello,

también es interesante el estudio de las células sanguíneas, como fuentes alternativas de marcadores [49]. La búsqueda de biomarcadores en monocitos circulantes usando estrategias proteómicas se ha convertido en una aproximación fructífera, teniendo en cuenta que los monocitos, como el plasma, suponen una muestra de fácil acceso y son células esenciales en el desarrollo del proceso aterosclerótico, desde la formación de la estría grasa y la placa de ateroma, hasta la ruptura de la misma. Todo esto hace pensar que el análisis proteómico de estas muestras puede proporcionarnos información sobre la biología del proceso aterosclerótico y permitirnos identificar nuevos biomarcadores potenciales de esta enfermedad.

B) PROTEÓMICA

En los últimos años se ha producido un fuerte avance en la proteómica, ciencia que estudia la expresión de proteínas a nivel global empleando para ello una serie de técnicas que permiten el análisis de todas las proteínas presentes en una muestra biológica [71-73]. El estudio del proteoma es, probablemente, el sistema experimental más adecuado para analizar células y tejidos, puesto que examina directamente el producto final del genoma. Este tipo de estudio requiere la utilización de un método de separación de proteínas combinado con la identificación posterior de cada proteína individual, generalmente mediante espectrometría de masas (MS) que, debido a su mayor sensibilidad y gran capacidad de procesamiento [74], ha reemplazado a la secuenciación de Edman en esta tarea.

Uno de los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica en los últimos tiempos es la dificultad que supone la identificación de todas las proteínas presentes dentro de una muestra biológica compleja. Esta dificultad se ve agravada por el limitado rango dinámico de concentración que las técnicas actuales son capaces de resolver [75]. Otros problemas están asociados a la evaluación de la enorme cantidad de información que genera esta tecnología, que complica la selección e interpretación de los datos potencialmente útiles de entre todos los obtenidos.

1. Métodos de separación de proteínas.

Puesto que la mayoría de las muestras biológicas son mezclas complejas de proteínas (que no pueden ser analizadas directamente por MS), los estudios proteómicos requieren el uso de una o varias técnicas de separación de proteínas previas al análisis mediante MS. Las más habituales son la electroforesis (especialmente la electroforesis

bidimensional o “2-DE”) y la cromatografía (sobre todo la cromatografía líquida de alta resolución o “HPLC”).

1.1. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida (“liquid chromatography”, LC) es una técnica de fraccionamiento que puede aplicarse para separar proteínas o péptidos según diferencias en sus propiedades físicas y/o químicas, utilizando para ello diversos tipos de soporte cromatográfico (intercambio iónico, fase reversa, exclusión molecular, afinidad, etc.). Puede utilizarse como un paso de purificación previo o posterior a la 2-DE [76-78], o como una alternativa a la misma, que permite además el acoplamiento directo de la columna con el espectrómetro de masas mediante la ionización con ESI (figura I_04) [79], lo que posibilita la automatización de este proceso [80, 81]. Este hecho hace que las técnicas basadas en la separación cromatográfica conectada a espectrometría de masas en tándem, como la tecnología multidimensional de identificación de proteínas (“multidimensional protein identification technology”, MudPIT), superen a las técnicas basadas en gel, en rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes muestras y condiciones [82-86]. Sin embargo, el mayor defecto de esta técnica es la carencia de información cuantitativa, aunque el desarrollo de técnicas de marcaje isotópico de proteínas, como ICAT (“Isotope-coded affinity tag”) e iTRAQ (“Isotope tags for relative and absolute quantitation”) [87-89], está compensando esta desventaja.

1.2. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (“2-dimensional electrophoresis”, 2-DE) es una técnica de separación de mezclas complejas de proteínas de gran capacidad resolutive. Consistente en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis realizadas sobre la misma muestra [90, 91]. En primer lugar se realiza un isoelectroenfoco (“isoelectric focusing”, IEF) donde las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoelectrico (pI). A continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), donde las proteínas se separan en función de su masa molecular. La dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones. La técnica fue desarrollada inicialmente en los años 70 por Kenrick & Margolis [92], Klose [93] y O’ Farrell [94], pero su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la invención de un método para generar gradientes de pH inmovilizados (“immobilized pH

gradients”, IPG) [95]. Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y permitieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles hoy día en Internet [96]. En los últimos tiempos, el desarrollo de la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos. Se trata de una técnica basada en el marcaje fluorescente de las proteínas previo a su separación, lo que le otorga una gran precisión en la cuantificación, que además permite la separación de varias muestras proteicas en un mismo gel [97], incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras.

2. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (“mass spectrometry”, MS) es una tecnología analítica de gran potencia [74, 98], que requiere la conversión de los compuestos analizados a iones en fase gaseosa, los cuales se separan en función de su relación masa /carga (m/z), lo que permite averiguar su masa molecular con gran precisión [74]. El desarrollo a finales de los años 80 de las técnicas de ionización suave [99, 100], que permiten generar iones a partir de analitos grandes y no volátiles, amplió la aplicabilidad de la espectrometría de masas a las biomoléculas (incluyendo las proteínas) e inició una rápida evolución de esta tecnología que continúa hoy en día [98, 101].

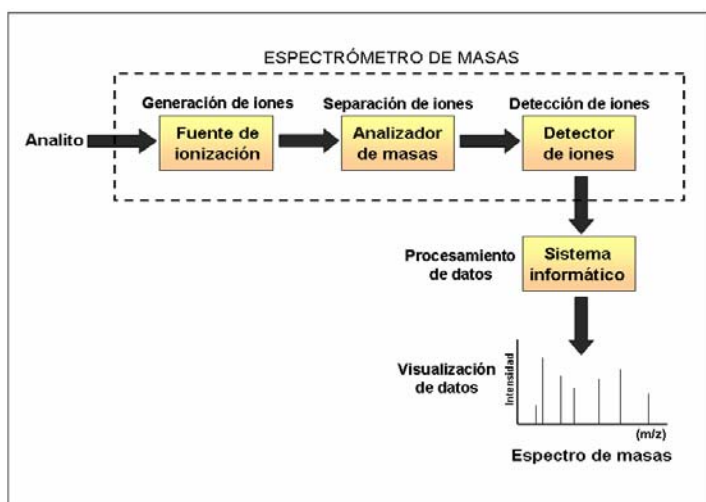


Figura I_03: Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas. Existen tres componentes esenciales: la fuente de ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q, IT o una combinación de los anteriores en el caso de espectrómetros en tándem o híbridos) y el detector de iones. Las señales captadas por el detector son integradas en un sistema informático (externo al espectrómetro de masas) que genera los gráficos conocidos como espectros de masas.

2.1. Espectrómetros de masas.

Los espectrómetros de masas están generalmente constituidos por tres elementos (figura I_03): una fuente de iones que ioniza y vaporiza las muestras, un analizador de masas, que separa los iones en función de su relación m/z y un detector de iones, que

genera señales proporcionales a la abundancia relativa de cada ion. Los datos registrados por el detector son procesados mediante programas de ordenador específicos, que habitualmente generan gráficos de abundancia relativa de iones frente a m/z conocidos como espectros de masas. Aunque existen múltiples métodos de ionización, sólo los métodos de ionización suave permiten el análisis de biomoléculas (figura I_04): la desorción/ionización mediante láser inducida por matriz (“matrix-assisted laser desorption/ionization”, MALDI) [100] y la electronebulización o electrospray (“electrospray ionization”, ESI) [99]. También se utilizan diferentes analizadores de masas, existiendo 3 tipos principales para analizar biomoléculas: separación de los iones por “tiempo de vuelo” (“time-of-flight”, TOF), separación por campos electromagnéticos oscilatorios generados por “cuadрупolos” (“quadrupole”, Q) y por último, separación por expulsión selectiva de los iones de un espacio tridimensional que actúa como trampa o “trampa iónica” (“ion trap”, IT) [74, 102, 103].

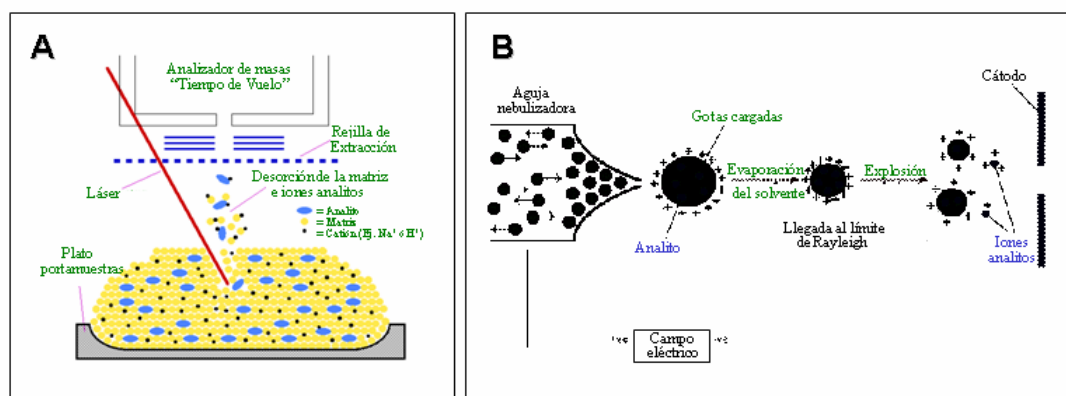


Figura I-04: Fuentes de ionización en espectrometría de masas. (A) MALDI. (B) ESI.

Para identificar los diferentes espectrómetros de masas, se usa habitualmente una nomenclatura sencilla basada en los acrónimos de las partes que componen el espectrómetro (p. ej., MALDI-TOF, ESI-IT,...). Para el análisis de secuencia, se pueden utilizar 2 analizadores de masas en tándem en el tiempo como las trampas iónicas, o tándem en el espacio como el TOF-TOF [104]. En los últimos años, se han desarrollado varios espectrómetros de masas de diseños híbridos que complementan a los analizadores de masas en tándem convencionales, como el Qq-TOF [105], Q-TRAP [106] y la trampa lineal-Resonancia iónica ciclotrón transformada de Fourier (LTQ-FT-ICR) [107-109]. Existen además otras aplicaciones de la espectrometría de masas basadas en la interacción de las proteínas con diferentes soportes cromatográficos, como la desorción/ionización mediante láser realizada por superficie-tiempo de vuelo (“surface-enhanced laser desorption/ionization-time-of-flight”, SELDI-TOF) [110, 111],

en el cual las proteínas son retenidas en una superficie cromatográfica sobre la que se deposita una matriz de cristalización, para permitir su detección en un analizador de masas de tipo TOF.

2.2. Identificación de proteínas.

La espectrometría de masas proporciona medidas muy precisas de la masa molecular y carga de proteínas o péptidos en una muestra. Las medidas de masas de las proteínas intactas pueden proporcionar información rápida y valiosa sobre el perfil proteico de una muestra, aunque a la hora de identificar una proteína no es práctico basarse únicamente en su relación m/z , ya que existen múltiples factores (procesamientos pre o postraduccionales) que pueden variar la masa molecular real de una proteína respecto a la masa teórica de la base de datos. Además, cuanto mayor es la masa de una proteína, menor es la exactitud de la medida. Por ello, se han desarrollado estrategias complementarias para la identificación de proteínas, como la “huella dactilar peptídica”. Esta técnica se basa en las medidas de las masas de los péptidos obtenidos tras la digestión enzimática de una proteína. La tripsina es la proteasa más comúnmente utilizada, ya que su corte altamente reproducible en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina permite identificar la proteína mediante la comparación de los valores de masa peptídica medidos (reales) con los valores calculados (teóricos) en la digestión virtual de todas las proteínas en la base de datos [112, 113]. La fiabilidad de este método depende de varios factores, entre ellos la precisión en la medida de la masa de los péptidos [112], el número de proteínas presentes en la muestra digerida, el tamaño de la proteína digerida (las proteínas de alto masa molecular generan un mayor número de péptidos por lo que es más probable identificarlas respecto a las pequeñas) y la calidad de las bases de datos empleada. Existen sistemas de puntuación (el más utilizado es el algoritmo denominado “Molecular Weight Search” o “MOWSE”) [114], cuyo objetivo es compensar estos problemas potenciales. Los diferentes programas informáticos que existen en la actualidad para el análisis de los datos generados por de espectrometría de masas (Mascot [115], ProFound [116], etc) incluyen estos sistemas de puntuación. Los programas comparan las medidas obtenidas con la base de datos, evaluando y ordenando los resultados de acuerdo con el sistema de puntuación. El uso de dos analizadores de masas consecutivos (espectrometría de masas en tándem o MS-MS), permite determinar la secuencia de aminoácidos (total o parcial) de un péptido [74, 98, 117] debido al hecho de que los péptidos se fragmentan de un modo predecible

al colisionar con un gas (disociación inducida por colisión-CID) [117]. La espectrometría de masas en tándem puede llevarse a cabo empleando tanto ionización mediante ESI (p. ej. ESI-triple-cuadrupolo o ESI-Qq-TOF) [118], como MALDI (MALDI-TOF-TOF) [104]. A menudo los espectros de fragmentación de tan solo unos pocos péptidos son suficientes para la identificación de la proteína de forma inequívoca [74, 112]. Tras la adquisición de los datos, éstos son enfrentados a las bases de datos de secuencia de modo automático [119] o interpretados manualmente [120, 121].

3.Aplicaciones del análisis proteómico.

En función del objetivo que se quiera alcanzar, se pueden utilizar diferentes tipos de análisis proteómico. La definición clásica de proteómica incluye el análisis a gran escala de la expresión e identificación de todas las proteínas de células o tejidos. Cuando un estudio se ciñe a esta definición, podemos decir que se trata de un estudio descriptivo del proteoma. De este modo, la proteómica descriptiva incluiría el análisis a gran escala de la expresión de proteínas de células o tejidos, la identificación de las mismas y la construcción de mapas bidimensionales y/o bases de datos de los mismos [71, 77, 122, 123]. Sin embargo, la expansión de la proteómica hacia otras áreas más allá de la pura descriptiva, ha permitido la aparición de la proteómica de expresión diferencial, la proteómica funcional (o de interacciones), los estudios de modificaciones postraduccionales y los análisis de perfiles proteicos. La proteómica de expresión diferencial requiere la comparación, cuantificación e identificación de patrones de expresión proteicos entre diferentes estados fisiológicos de un mismo tejido o tipo celular. En este tipo de abordaje lo más frecuente es utilizar la electroforesis bidimensional [124, 125], tanto convencional [66, 126, 127], como 2D-DIGE [128, 129], ya que en la actualidad proporciona una información cuantitativa que los métodos basados en LC-MS no pueden aportar, aunque esto podría cambiar con la evolución de los métodos de marcaje isotópico. La proteómica comparativa permite detectar en ocasiones posibles variaciones de las proteínas que deberán ser caracterizadas mediante el análisis de modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, acetilaciones, glicosilaciones, ubiquitinaciones y nitrosilaciones entre otras [130-132]. En cuanto a la proteómica funcional, una gran parte de la investigación se centra en las interacciones proteína-proteína de complejos proteicos específicos [133-135], siendo posible también estudiar las interacciones con otras moléculas [136-138]. Por último, el análisis de perfiles proteicos consiste en un muestreo rápido de las muestras mediante MS, que

apenas requiere preparación de la muestra. El espectro de masas constituye un perfil proteico que puede ser comparado en diferentes muestras, lo que permite identificar diferencias en la abundancia relativa de proteínas, que pueden ser posteriormente purificadas e identificadas. Estas técnicas, entre las que se incluye SELDI-TOF MS [111, 139], son complementarias a la proteómica cuantitativa. Otra técnica de análisis de perfiles que puede complementar en este caso a la proteómica descriptiva es la imagen por espectrometría de masas (“imaging MS”, IMS), en la cual se analizan directamente cortes histológicos con MALDI-TOF MS, proporcionando información espacial de la distribución de péptidos y/o proteínas en el corte original [140-143].

3.1. Análisis de expresión diferencial mediante 2-DE y MALDI-TOF

En el caso de la búsqueda de biomarcadores las aplicaciones más adecuadas son el análisis de perfiles proteicos y la proteómica de expresión diferencial. Cuando se emplea esta última lo más habitual es la utilización de la electroforesis bidimensional (2-DE ó 2D-DIGE) combinada con la identificación mediante MS MALDI-TOF.

3.1.1. Electroforesis bidimensional.

El protocolo de preparación de un gel bidimensional consta de varias etapas, que incluyen la preparación de la muestra, la primera dimensión mediante IEF, la segunda dimensión mediante SDS-PAGE, la visualización de las proteínas y la digitalización y análisis de los mapas bidimensionales.

3.1.1.1. Preparación de la muestra para la primera dimensión.

La preparación de la muestra es un paso esencial para desarrollo de la 2-DE, que requiere la eliminación de los posibles contaminantes y/o proteasas presentes en la muestra [144]. Los contaminantes se pueden eliminar mediante técnicas como la diálisis, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en fase reversa o precipitación de proteínas [145]. En el caso de las proteasas, es posible bloquearlas mediante inhibidores específicos, aunque es necesario comprobar previamente que sean compatibles con la 2-DE [146, 147]. A continuación, las proteínas han de solubilizarse en un medio que debe contener: un agente caotrópico neutro para solubilizar las proteína (normalmente urea); un detergente no iónico o “zwitteriónico”, para prevenir agregaciones (NP-40, CHAPS, etc.); un agente reductor, para romper los puentes disulfuro (β -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), etc.); y finalmente anfolitos, que

potencian la solubilidad de las proteínas, minimizando la agregación por interacciones de carga (aunque pueden llegar a interferir con el IEF si su concentración es demasiado elevada) [144].

3.1.1.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).

Las proteínas son moléculas anfotéricas que pueden estar cargadas positiva o negativamente en función del pH del medio en que se encuentren. El isoelectroenfoque separa las proteínas de acuerdo a sus pI. Si se aplica un campo eléctrico a un gradiente de pH, las proteínas que estén dentro migrarán hasta alcanzar el pH equivalente a su pI, donde pierden toda carga y dejan de moverse. Por tanto, para realizar un IEF necesitamos un gradiente de pH (IPG) [95] y una fuente capaz de generar una diferencia de potencial. Actualmente los gradientes IPG se venden de forma comercial, en tiras de plástico que llevan adherida la acrilamida con el gradiente de pH. Dicha acrilamida está deshidratada para mejorar su conservación, por lo que es necesario rehidratar la tira con la solución adecuada antes de comenzar el IEF. La muestra se puede aplicar durante o después de este paso de rehidratación [90, 148], tras el cual se desarrolla el IEF, que debe constar de varias etapas, ya que la conductividad eléctrica del gel va cambiando a lo largo del proceso [96]. Al igual que ocurría con la preparación previa, el tipo de rehidratación, la forma de aplicación, así como las etapas y duración del IEF deben ser determinados empíricamente para cada tipo de muestra biológica.

3.1.1.3. Segunda dimensión. SDS-PAGE.

Antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE según Laemmli [149], las tiras IPG deben ser tratadas con un tampón de equilibrado, que contiene varios reactivos necesarios para la separación en la segunda dimensión. El más importante de ellos es el SDS, que es fundamental en el desarrollo de este tipo de electroforesis, ya que desnaturaliza las proteínas y forma con ellas complejos cargados negativamente que migran hacia el polo positivo durante el proceso. La solución de equilibrado contiene también urea y glicerol, para reducir los efectos electroendosmóticos [96]. El equilibrado se realiza en dos pasos: un primero en el que se añade DTT al tampón anteriormente descrito y un segundo paso, en el que se añade iodoacetamida. Estos dos pasos previenen la reoxidación de las proteínas y evitan la aparición de los patrones distorsionados por rayas verticales (“streaking”) [150]. A continuación, las proteínas enfocadas y equilibradas en la tira IPG vuelven a ser separadas en base a su masa

molecular empleando SDS-PAGE en la segunda dimensión (en dirección perpendicular a la primera). La elección del porcentaje de acrilamida y el tipo de gel (homogéneo o en gradiente) depende del rango de masa molecular que queremos resolver. Para análisis de mezclas complejas se suelen utilizar geles en gradiente.

3.1.1.4. Visualización, Tinción de geles bidimensionales.

Una vez que la segunda dimensión ha finalizado, las manchas proteicas deben ser visualizadas, para lo cual existen varios métodos de tinción, con diferentes características (sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad) [151]. El método más sensible es la tinción con plata, aunque el rango de detección lineal es más amplio en las técnicas que utilizan compuestos fluorescentes (p. ej. SYPRO) [152]. La aplicación de estos métodos es posterior al desarrollo de la 2-DE, excepto en el caso de la electroforesis bidimensional diferencial (Two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE) [97]. Se trata de una técnica comercializada como “Ettan DIGE proteomics system” (GE Healthcare), que permite un análisis cuantitativo de la expresión diferencial entre muestras biológicas, basándose en las propiedades específicas de tres fluorocromos con propiedades espectrales diferenciales (Cy2, Cy3 y Cy5; “CyDye DIGE Fluor minimal dyes”). Estos compuestos fluorescentes, que han sido diseñados para igualar su masa y carga, se utilizan para marcar covalentemente las proteínas de diferentes muestras en residuos de lisina antes de su separación en un mismo gel bidimensional. Las proteínas marcadas pueden ser detectadas a las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas, empleando un escáner especial para la detección de señales fluorescentes. Las señales detectadas se pueden entonces comparar empleando las aplicaciones informáticas adecuadas. Posteriormente se pueden teñir los geles tras la digitalización de las imágenes fluorescentes, con azul Coomassie o SYPRO Ruby. Esta metodología tiene múltiples ventajas, ya que todas las muestras están sujetas a las mismas manipulaciones experimentales y, al tratarse de un método de fluorescencia [152], proporciona una mayor sensibilidad y una mayor linealidad en el rango dinámico de detección que otras técnicas de tinción. Por ello, los cambios en la expresión de las proteínas pueden ser detectados y cuantificados con mayor nivel de confianza. Para realizar un experimento de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) se requiere un diseño experimental minucioso, en función del objetivo buscado.

3.1.1.5. Adquisición de la imagen y análisis de geles bidimensionales.

Las imágenes de los geles deben ser digitalizadas y guardadas en archivos de imagen informáticos para poder ser analizadas. La complejidad de los geles bidimensionales requiere el empleo de paquetes informáticos especializados para su análisis [153-155], que deben ser capaces de realizar una serie de funciones imprescindibles como la edición y optimización de la imagen del gel, la detección de las manchas proteicas, el emparejamiento de los puntos en los diferentes geles objeto de estudio y el análisis estadístico y cuantitativo final.

3.1.2. MALDI-TOF.

El proceso de ionización mediante MALDI (figura I_04A) produce la vaporización inducida por láser de una mezcla sólida de un analito (proteína o péptido) y una matriz depositada en una placa metálica. En dicha mezcla, que debe haber sido cocrystalizada previamente, la matriz actúa como aceptor de la energía transmitida por el láser y la transfiere a las moléculas de analito, produciendo la ionización y sublimación de ambas moléculas (matriz y analito) a fase gaseosa [156]. La aplicación de potencial eléctrico elevado (20-25 KV), acelera los iones desde la placa de muestra hasta el tubo de vuelo del analizador TOF, donde no existe campo eléctrico alguno. Para un voltaje de aceleración dado, el tiempo de vuelo (TOF) empleado por un ión para llegar al detector (microsegundos), es proporcional a su m/z . De esta manera, los péptidos pequeños vuelan más rápido que los mayores, por lo que el detector captará las masas en orden creciente (modo lineal). El resultado es la representación de la intensidad (abundancia) de cada péptido frente a la relación m/z , dando lugar al espectro de masas [103, 157]. Es posible mejorar la resolución de MALDI-TOF empleando un espejo de iones o “reflector” al final del tubo de vuelo (figura I_05A) [74]. En el reflector, los iones son reflejados hacia el detector, compensando las pequeñas diferencias de energía cinética que puedan llevar dos iones idénticos, lo que aumenta mucho la exactitud en el rango de detección. La unión de dos analizadores TOF mediante una cámara de colisión situada entre ellos (figura I_05B) permite el aislamiento y la fragmentación de péptidos para analizar su secuencia de aminoácidos [104].

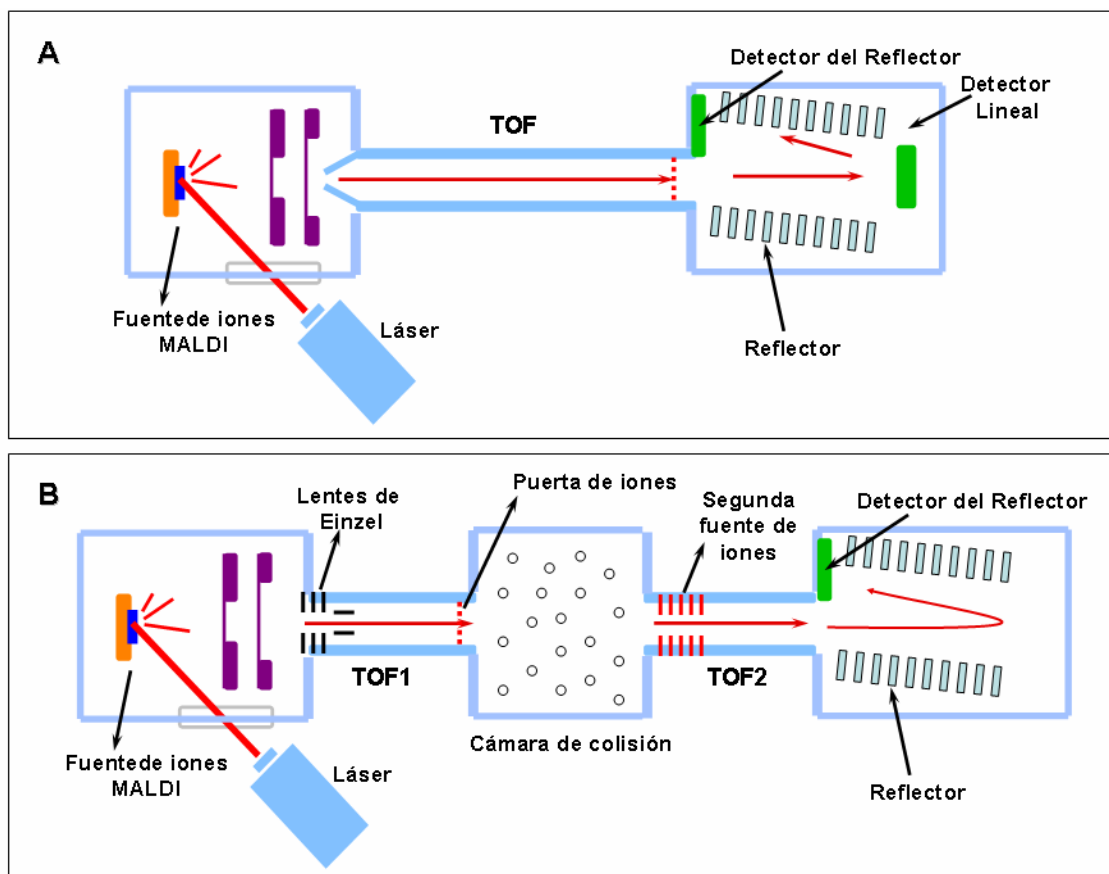


Figura I-05: (A) Representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF. Un pulso de láser irradia la muestra (cristalizada sobre la placa MALDI), causando la ionización y la vaporización de los péptidos. Estos son acelerados por un campo eléctrico que los dirige al analizador de masas (tubo de vuelo). Las diferencias de energía iniciales son corregidas mediante el reflector (o espejo de iones) y los iones llegan al detector, que contiene un fotomultiplicador que amplifica la señal. (B) Representación esquemática de un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF-TOF. Al igual que en el caso anterior, un pulso de láser irradia la muestra (cristalizada sobre la placa MALDI), causando la ionización y la vaporización de los péptidos. Estos son acelerados por un campo eléctrico que los dirige al primer analizador de masas (tubo de vuelo), al final del cual se encuentra una puerta de iones que regula el paso de los péptidos a la cámara de colisión (sólo pasarán los que tengan la m/z que haya sido seleccionada previamente). En la cámara de colisión los péptidos se fragmentan y son acelerados por un nuevo campo eléctrico que los dirige al segundo analizador de masas (también tiempo de vuelo). Las diferencias de energía iniciales son corregidas mediante el reflector (o espejo de iones) y los iones llegan al detector, que contiene un fotomultiplicador que amplifica la señal.

4. Antecedentes en proteómica cardiovascular

La investigación cardiovascular ha sido una de las áreas pioneras en la aplicación del análisis proteómico [158-161], desde los trabajos de Peter Jungblut y Michael Dunn [162-164]. El estudio de la expresión diferencial de proteínas es la estrategia fundamental para la búsqueda proteómica de nuevos biomarcadores de aterotrombosis.

4.1. Análisis proteómico de la placa de ateroma

Los primeros estudios de placas humanas ateroscleróticas por 2-DE se realizaron sobre extractos de tejido con estrías grasas en comparación con segmentos de aorta sanas, o sobre arterias coronarias con aterosclerosis en comparación con segmentos

sanos. Solo se detectaron cambios en proteínas plasmáticas (albumina, IgG), contaminantes del plasma, o en los niveles de la cadena ligera de la ferritina, probable contaminante de las plaquetas [165, 166]. Martinet et al. [167] realizaron un experimento de inmunodetección múltiple (823 anticuerpos monoclonales) en placas de ateroma carótideas humanas, comparando con arterias mamarias utilizadas como control. Así, identificaron variaciones en la expresión de 7 proteínas, una de ellas (ALG-2) con funciones pro-apoptóticas [168]. Mayr et al [169] han realizado un estudio proteómico mediante 2-DE de aortas ateroscleróticas en ratones deficientes de apo-E, en distintas fases del desarrollo de las lesiones. De las 79 proteínas alteradas en las diversas fases de la aterogénesis destacan las proteínas implicadas en inflamación (IgG), estrés oxidativo y metabolismo energético. Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes de estos estudios es la heterogénea composición celular de la placa aterosclerótica: mientras que las células musculares lisas predominan en el vaso normal, las que presentan lesiones avanzadas contienen abundantes macrófagos (células espumosas) y linfocitos T, aunque en los geles 2-DE solo se detectaron proteínas de las células musculares lisas [169]. Una estrategia más directa para identificar posibles nuevos biomarcadores de aterosclerosis es la utilizada por Duran et al. [62] que estudiaron las proteínas secretadas por placas de ateroma de carótidas humanas (procedentes de endarterectomias), cultivadas *in vitro*, en comparación con segmentos sanos y arterias control (mamarias), incubándolas en un medio libre de proteínas. Los sobrenadantes se analizaron mediante 2-DE y se identificaron más de 80 proteínas diferencialmente expresadas en las placas complicadas respecto a las zonas adyacentes sanas [49]. Entre las proteínas con niveles disminuidos se encontró la HSP27 (Proteína de choque térmico de 27kDa) que ha sido posteriormente identificada como un marcador potencial de aterosclerosis [170].

4.2. Análisis proteómico de las células que constituyen la placa de ateroma

Una alternativa al estudio de la pared vascular es el análisis proteómico de los tipos celulares que intervienen en esta patología (células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos y/o células espumosas), en cultivos que simulen las condiciones de las lesiones ateroscleróticas. En este sentido, el estudio de las células endoteliales es de gran importancia [171, 172]. Como se explicó anteriormente, el daño endotelial es el evento fundamental que inicia el proceso aterosclerótico [15]. El efecto

del oxLDL en las células endoteliales se considera generalmente el evento más temprano en la aterogénesis. Para entender el mecanismo mediante el cual el oxLDL causa la disfunción, se expuso un cultivo de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) a una concentración de oxLDL que induce la disfunción celular. El análisis proteómico de estas células mostró que la expresión de la Nucleofosmina, la Estatmina y la Nucleolina se veía afectada por la exposición al oxLDL [173]. Otro de los sucesos clave en el proceso aterogénico es la proliferación y migración de las células musculares lisas. Para identificar los cambios en la expresión de proteínas asociados a crecimiento hiperplásico o hipertrófico, Patton et al. [174] realizaron un experimento de 2-DE con extractos de células musculares lisas aórticas de rata quiescentes o expuestas a factores de crecimiento. Encontraron mediadores de plegamiento proteico (HSP60, HSP70, Proteína Disulfuro-isomerasa) y de síntesis proteica (Factor de elongación EF-1 β) entre las proteínas aumentadas por la exposición a factores de crecimiento, junto con proteínas del citoesqueleto (Vimentina y Actina). Además, se sabe que las fuerzas mecánicas a que se ven sometidas las paredes de los vasos juega un papel en el proceso de aterogénesis, ya que las lesiones se desarrollan espontáneamente en lugares preferenciales del sistema vascular. Por ello, Mc Gregor et al. [175] estudiaron los cambios en los perfiles de expresión de las proteínas de las células musculares lisas expuestas a estrés hemodinámico identificando las proteínas Gelsolina, HSP27 y CapZ. Del mismo modo, otro miembro de la familia de la Gelsolina (CapG) fue identificado al estudiar los cambios en células endoteliales aórticas expuestas a flujo oscilatorio y/o laminar [176].

En las lesiones ateroscleróticas, los monocitos migran a la pared vascular y se diferencian a macrófagos, algunos de los cuales se cargan de lípidos tras al contactar con el oxLDL. Para imitar el comportamiento de estas células en las lesiones ateroscleróticas, es necesario estudiar la diferenciación de monocito a macrófago y la carga lipídica. En este sentido, se analizaron la expresión génica y proteica de ambos procesos [177, 178], empleando células THP-1 tratadas con LDL nativo o modificado (oxidado o acetilado). Al comparar los resultados de los chips de cDNA y de anticuerpos, se hace evidente que los cambios a nivel proteico no siempre se corresponden con cambios a nivel de mRNA. Sorprendentemente, los niveles de expresión proteicos estudiados mediante los chips de anticuerpos no revelaron grandes cambios en la expresión durante la carga lipídica. En otros estudios se compararon mediante 2-DE los extractos proteicos de células monocíticas THP-1 tratadas con

oxLDL (como modelo de célula espumosa) con las células nativas, no modificadas (estimuladas con LDL), para tratar de identificar proteínas que pudiesen estar implicadas en el proceso aterosclerótico. Al menos 150 manchas proteicas se expresaban diferencialmente y 93 de ellas pudieron identificarse con éxito. Un grupo grande correspondía a proteínas metabólicas, como la Piruvato-quinasa, Proteína Disulfuro-isomerasa, Acetil-CoA Aciltransferasa, y Enolasa-1, entre otras. Otro grupo de proteínas eran componentes de las rutas de diferenciación [179]. Siguiendo una metodología similar, Fach et al., [180] estudiaron las proteínas secretadas al medio de cultivo por células monocíticas THP-1 estimuladas con oxLDL mediante cromatografía multidimensional, identificando 59 proteínas cuya concentración aumentaba en el caso de las células tratadas con oxLDL en comparación con las tratadas con LDL. Estas proteínas pertenecían a 7 grupos, entre los que se incluyen proteínas de unión de ácidos grasos, ciclofilinas, catepsinas, y proteínas tipo Uroquinasa activador del receptor de Plasminógeno.

Sin embargo, aunque la mayoría de estos estudios están aportando datos que contribuyen al esclarecimiento del proceso aterotrombótico, son aproximaciones *in vitro* que no pueden aplicarse al estudio de pacientes. Por tanto, estas investigaciones deberían complementarse con nuevos estudios que permitan el análisis de otros tipos de muestra relacionados con la patología y que procedan de pacientes.

4.3. Análisis proteómico de los elementos de la sangre en pacientes con SCA.

Teniendo en cuenta la limitación que supone la falta de acceso a la pared vascular de los pacientes con aterotrombosis, resulta necesario buscar muestras alternativas para tratar de encontrar nuevos biomarcadores. En este sentido, existen datos que sugieren una conexión entre lo que ocurre en la pared vascular durante la aterotrombosis y los elementos de la sangre [54]. Además, el análisis de las células circulantes y/o del plasma, puede proporcionar una visión global de la respuesta del cuerpo humano ante esta patología. Las células circulantes pueden contener información que refleje un estado proinflamatorio o procoagulante relacionado con la patología [181]. Por su parte, el descubrimiento, la identificación y validación de las proteínas asociadas con el SCA en plasma es una labor compleja que, no obstante, puede resultar de gran utilidad.

4.4. Nuevas fuentes de biomarcadores: Monocitos circulantes

Como se ha comentado previamente, la formación de la placa de ateroma está considerada como una respuesta inflamatoria a la invasión de lipoproteínas en la pared arterial y a la presencia de otros factores de riesgo coronario. Aunque, en principio, se trata de un fenómeno defensivo, esta respuesta contribuye finalmente a la generación y desarrollo de la lesión ateromatosa. La acumulación de lipoproteínas oxidadas (oxLDL) bajo el endotelio induce la expresión de moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) y de factores quimiotácticos, como la Proteína quimiotáctica 1 de monocitos (MCP-1) [18]. Los monocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales que expresan estas moléculas e interaccionan con MCP-1 a través de los receptores CCR2 (figura I-06) [13]. Esto provoca su extravasación al interior de la pared vascular, donde se diferencian a macrófagos en respuesta a factores producidos localmente, como el factor estimulador de monocitos (M-CSF) y oxLDL.

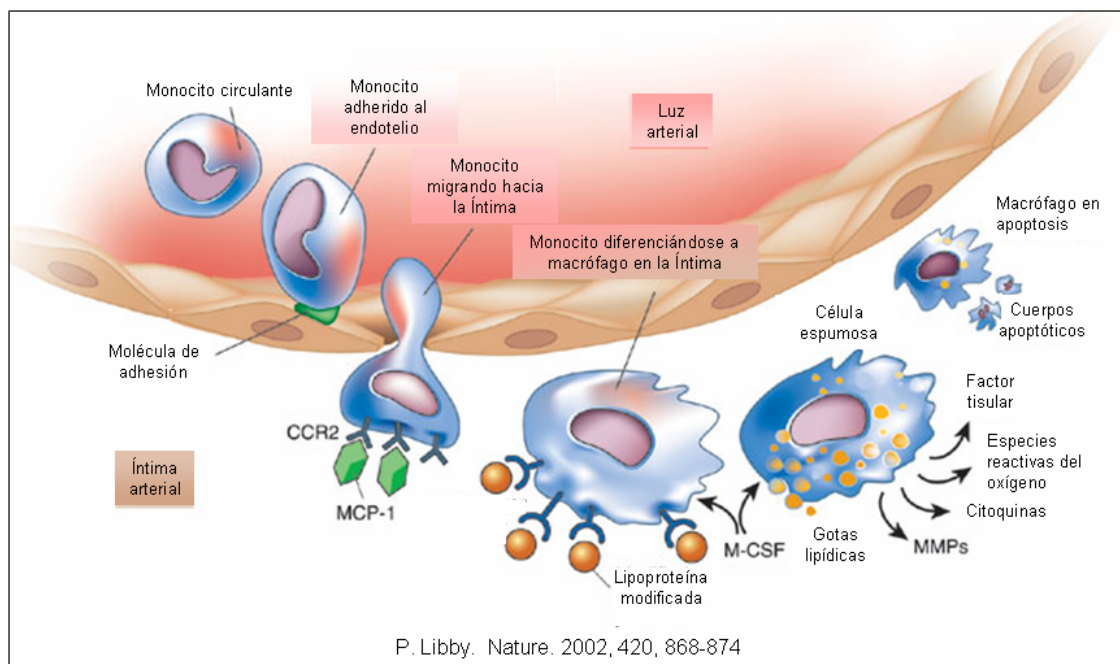


Figura I_06: Representación del mecanismo de reclutamiento de monocitos por la pared arterial y su diferenciación a macrófagos. Los monocitos circulantes se unen a las células endoteliales mediante moléculas de adhesión que son inducidas en respuesta a señales inflamatorias (oxLDL). Los monocitos migran a través de la pared endotelial a la íntima, donde se diferencian rápidamente a macrófagos en respuesta a la producción de factores locales. Los macrófagos cargados de lípidos se transforman en células espumosas que, finalmente, entran en apoptosis y mueren. M-CSF, factor estimulador de monocitos; MMPs, metaloproteinasas.

Este proceso de diferenciación incluye un incremento en la expresión de receptores para las oxLDL, mediante los cuales los macrófagos captan oxLDL y desechos de células apoptóticas ricas en colesterol. De este modo, los macrófagos cargados con abundantes acúmulos lipídicos, se transforman en células espumosas cuya presencia se relaciona con la formación de la estría grasa [19-21]. La evolución de la lesión implica la intervención de otros tipos celulares, principalmente células musculares lisas que migran desde la túnica media de la pared vascular. Estas células recubren el núcleo lipídico, secretando diversos componentes de la matriz extracelular (fundamentalmente colágeno) para formar una cubierta fibrosa. La consistencia de esta cubierta, que depende de varios factores [17], dictaminará la probabilidad de que aparezca una fisura en la misma. Un factor esencial es la liberación por parte de los macrófagos de varias metaloproteinasas (MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13) que digieren el colágeno y debilitan la cubierta fibrosa. Esta debilidad provoca que la placa sea más propensa y vulnerable a la rotura y ulterior trombosis por contacto de su núcleo lipídico con la sangre, como ya se describió anteriormente. Así, se ha comprobado que existe una mayor presencia de macrófagos y metaloproteinasas en las placas responsables de un SCA [6, 24]. Por tanto, podemos decir que los macrófagos desempeñan una función esencial en todas las fases de la aterosclerosis, desde el inicio hasta la posible rotura de la placa y el desencadenamiento del posible infarto de miocardio. Teniendo en cuenta que los macrófagos presentes en la lesión fueron antes monocitos circulantes, el grado de actividad proinflamatoria que exhiben en la lesión podría estar ya presente en estas células. Además, ciertas poblaciones de células espumosas parecen ser capaces de emigrar desde las placas ateroscleróticas, lo cual permite su re-entrada en la sangre [182, 183]. Por tanto, el análisis proteómico podría mejorar nuestros conocimientos sobre el papel de los monocitos / macrófagos en el proceso aterosclerótico [184, 185].

4.5. La complejidad del proteoma del plasma

El plasma es una de las muestras más ricas en contenido proteico, en la que predominan una serie de proteínas muy abundantes (proteínas mayoritarias del plasma), junto con proteínas producidas por las células circulantes de la sangre y otros tejidos [70, 186]. Además, puede transportar proteínas específicas de tejidos que hayan sido liberadas en la sangre por diferentes motivos. Este hecho hace suponer que el plasma contiene información sobre el estado fisiológico de las diferentes partes del organismo [49].

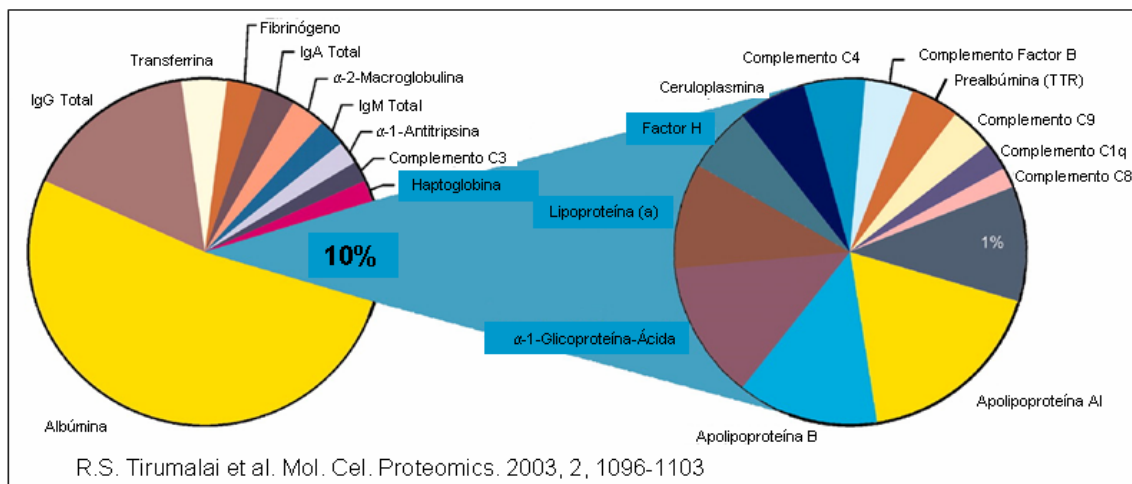


Figura I_07: Gráfico representativo de la contribución relativa de las proteínas en el plasma, donde 22 proteínas constituyen el 99% de la concentración proteica del plasma.

Se trata además de una muestra de fácil obtención y manipulación, lo que la convierte en la más importante desde el punto de vista clínico y se emplea rutinariamente con fines diagnósticos [70]. A pesar de ello, el plasma humano no se ha utilizado a menudo en proteómica clínica, ya que tan sólo 22 proteínas, entre las que se encuentran la albúmina, inmunoglobulinas, haptoglobinas y transferrinas, representan aproximadamente el 99% del contenido proteico total (figura I_07) [187, 188]. De hecho, se trata probablemente de la muestra biológica con un mayor rango dinámico de concentración que separa en unos 10^9 órdenes de magnitud (figura I_08) [70] la proteína más abundante del plasma, la albúmina (30-50 mg/ml), de las más escasas, como la IL-6 (0-5 pg/ml). Asimismo, muchas de las proteínas del plasma presentan una masa molecular y punto isoeléctrico semejantes, por lo que las proteínas más abundantes podrían entorpecer la detección de posibles biomarcadores de enfermedad que se encontrasen en muy baja concentración. Esto ha supuesto una enorme dificultad a la hora de analizar el proteoma del plasma mediante 2-DE [70], debido al limitado rango dinámico que esta técnica es capaz de discriminar. Sin embargo, la evolución en los últimos años de metodologías como la cromatografía multidimensional [69, 189-191], o la tecnología SELDI [110] (que ha permitido la identificación de biomarcadores en varios patologías, especialmente en cáncer), está aportando nuevas y prometedoras opciones para el análisis de los fluidos biológicos.

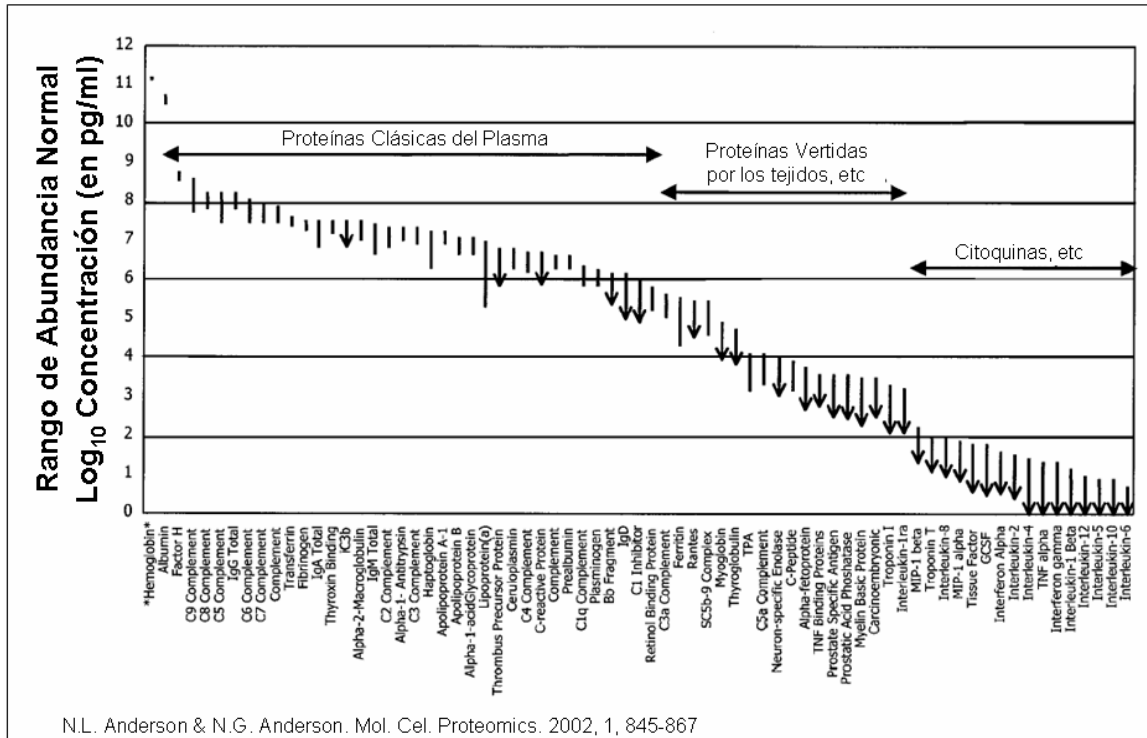


Figura I_08: Intervalos de concentración para 70 proteínas analizadas en plasma. La abundancia se representa en una escala logarítmica que abarca 12 órdenes de magnitud. En los casos en que sólo se conoce el límite superior, el extremo inferior de la línea que representa el intervalo es una punta de flecha. Las proteínas clásicas del plasma se agrupan a la izquierda del gráfico (proteínas abundantes); las proteínas liberadas ocasionalmente por los tejidos al torrente sanguíneo (p. ej. enzimas y troponinas) se agrupan en el centro; y las citoquinas se agrupan a la derecha (poco abundantes). Se incluye la hemoglobina (en el extremo izquierdo del gráfico) como referencia. TPA, Activador de Plasminógeno en tejido; GCSF, Factor estimulador de Colonias de Granulocitos; TNF, Factor de necrosis tumoral.

También se han descrito últimamente numerosos métodos que facilitan el análisis del plasma mediante 2-DE [192-195], incluyendo métodos de afinidad (basados en anticuerpos) para eliminar las proteínas mayoritarias [196-200]. De entre ellos (tabla TI_01) los métodos de depleción múltiple han demostrado ser más útiles a la hora de analizar el plasma mediante electroforesis bidimensional [201], lo que aporta nuevas perspectivas al análisis proteómico del plasma como herramienta para la búsqueda de biomarcadores.

Sistema de depleción									
Proteínas deplecionadas	Aurum Serum Protein minikit (BioRad)	Proteo-Extract™ Albumin/IgG Removal Kit (Merck)	POROS® Affinity Depletion cartridges (Applied Biosystems)	Albumin and IgG Removal Kit (Amersham Biosciences)	Multiple Affinity Removal System (Agilent Technologies)			Proteome-Lab IgY-12 (1) (2)	ProteoPrep® 20 Plasma Immuno-depletion Kit (2)
					6 Proteínas (1)	7 Proteínas (1) (2)	14 Proteínas (1) (2)		
Albúmina	Ligando-colorante F3GA	Ligando de afinidad	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	IgY	Ac Pc y otros ligandos de afinidad
IgG	Proteína A	Proteína A	Proteína G	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	IgY	
IgA	-	-	-	-	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	IgY	
Transferrina	-	-	-	-	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	IgY	
α-1-Antitripsina	-	-	-	-	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	IgY	
Haptoglobina	-	-	-	-	Ac Pc	Ac Pc	Ac Pc	IgY	
Fibrinógeno	-	-	-	-	-	Ac Pc	Ac Pc	IgY	
α-2-Macroglobulina	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	IgY	
α-1-Glicoproteína-Ácida	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	IgY	
IgM	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	IgY	
Apolipoproteína A1	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	IgY	
Apolipoproteína A2	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	IgY	
Complemento C3	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	-	
Prealbúmina (TTR)	-	-	-	-	-	-	Ac Pc	-	
Apolipoproteína B	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ceruloplasmina	-	-	-	-	-	-	-	-	
Complemento C4	-	-	-	-	-	-	-	-	
Complemento C1q	-	-	-	-	-	-	-	-	
IgD	-	-	-	-	-	-	-	-	
Plasminógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	
Método de depleción	Cartuchos para centrífuga	Columna de gravedad	Columna para HPLC	Cartuchos para centrífuga	Columna para HPLC	Columna para HPLC	Columna para HPLC	Columna para HPLC	Cartuchos para centrífuga

Tabla I_01: Métodos de depleción de las proteínas mayoritarias del plasma disponibles en el mercado. Explica las proteínas que retira cada uno, el sustrato de afinidad utilizado para cada proteína y el formato de presentación de cada uno. **(1)** También disponible en formato “Cartucho para centrífuga”. **(2)** Estos métodos no estaban disponibles cuando comenzamos esta Tesis. Ac Pc, Anticuerpo policlonal; IgY, Inmunoglobulinas de ave.

Objetivos

La medicina sólo puede curar enfermedades curables.

Proverbio chino

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es el estudio de la expresión diferencial de proteínas en los elementos de la sangre (monocitos circulantes y plasma) de pacientes con SCA, durante y después del episodio agudo, con la finalidad de encontrar nuevas proteínas que pudieran estar implicadas en la fisiopatología de la aterotrombosis. Se trata de buscar nuevas dianas que puedan servir para ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el SCA y/o como candidatas a biomarcadores de la enfermedad, para lo cual planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1) Estudiar mediante electroforesis bidimensional la expresión diferencial de proteínas en monocitos circulantes de pacientes con SCA durante y después del episodio agudo, frente a controles sanos y pacientes estables.
- 2) Examinar los efectos del tratamiento con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (Atorvastatina) sobre el proteoma de los monocitos circulantes de pacientes con SCA tratados con este fármaco después del episodio agudo.
- 3) Establecer una metodología que permita analizar el plasma mediante electroforesis bidimensional, para estudiar la expresión diferencial de proteínas en plasma de pacientes con SCA durante y después del episodio agudo, frente a controles sanos y pacientes estables.
- 4) Examinar los efectos del tratamiento con Atorvastatina sobre el proteoma del plasma de pacientes con SCA tratados con este fármaco después del episodio agudo.
- 5) Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en los monocitos circulantes y el plasma de los pacientes con SCA.

Objetivos

- 6) Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en los monocitos circulantes y el plasma de los pacientes con SCA como consecuencia del tratamiento con Atorvastatina.

Materiales y Métodos

Si uno no puede explicar lo que ha estado
haciendo, su trabajo carecerá de valor.

Erwin Schrödinger

1. Selección de pacientes y obtención de las muestras

La selección de pacientes se realizó en la Fundación Hospital de Alcorcón, entre aquellos individuos admitidos en urgencias con síndrome coronario agudo (SCA) sin elevación del segmento ST en el electrocardiograma. Se tomaron como criterios de exclusión las enfermedades inflamatorias o tumorales, las alteraciones de la coagulación, otras cardiopatías significativas sin relación con la enfermedad coronaria o sus factores de riesgo (valvulopatías, afectaciones pericárdicas o miocardiopatías), exceptuando la hipertrofia secundaria del ventrículo izquierdo debida a hipertensión, tratamientos crónicos, excepto el de cardiopatía isquémica y sus factores de riesgo, angiogramas coronarios normales, fracciones de eyección menores de 0.45, haber sido sometido a cirugía o haber sufrido traumatismos mayores, eventos tromboembólicos o revascularizaciones en los seis meses previos. Fueron considerados posibles candidatos para entrar en el estudio aquellos pacientes con angina de grado III-IV (CCS) con descenso del segmento ST transitorio ($>0.05\text{mV}$) y/o inversión de la onda T ($>0.02\text{mV}$) de nueva aparición en el electrocardiograma (ECG) y/o troponina I positivo. Finalmente, cuarenta pacientes de entre 40 y 80 años de edad, que firmaron el correspondiente consentimiento informado, se incluyeron en el estudio. El cuarto día tras el ingreso, se les asignó un tratamiento de dos meses con Atorvastatina 80mg/d, o bien un tratamiento convencional, utilizando una tabla de números aleatorios (figura M_01). El tratamiento convencional podría incluir una estatina a la dosis asignada por el médico responsable. En todos los casos se realizó una angiografía coronaria y se recogieron muestras de sangre a diferentes tiempos (en el momento del ingreso en urgencias, a los 4 días, 2 meses y 6 meses después del episodio agudo) (figura M_01).

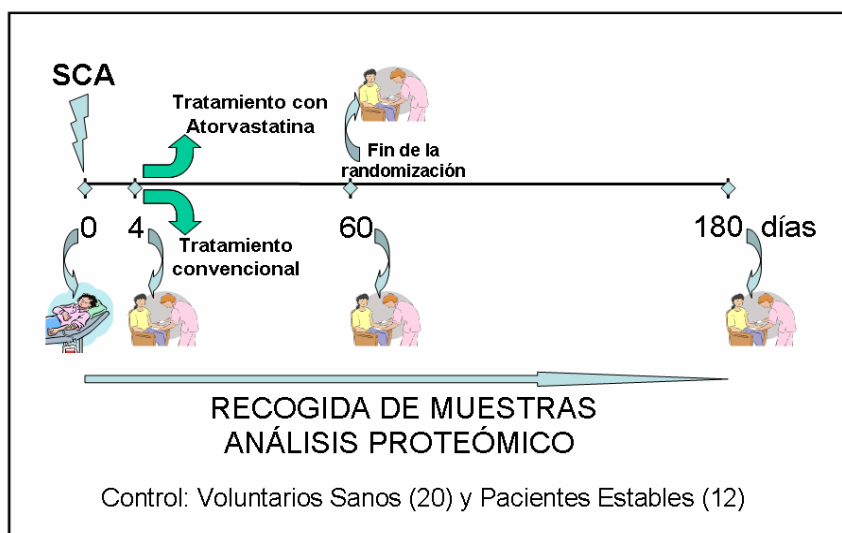


Figura M_01: Representación del proceso de obtención de muestras. Cuarenta pacientes fueron incluidos en el estudio y, el cuarto día tras el ingreso, se les asignó de forma aleatoria un tratamiento convencional o un tratamiento de dos meses con Atorvastatina 80mg/d. Tras los dos primeros meses todos los pacientes volvieron a recibir el mismo tratamiento. Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes incluidos en el estudio a diferentes tiempos (en el momento del ingreso en urgencias, a los 4 días, 2 meses y 6 meses después del episodio agudo). Además, se incluyeron en el estudio como grupos control 20 voluntarios sanos y 12 pacientes estables sin diferencias significativas en cuanto a edad y sexo respecto al grupo de pacientes con SCA.

La tabla TM_01 resume las características de los pacientes incluidos en el estudio. Además, se incluyeron en el estudio como grupos control 20 voluntarios sanos y 12 pacientes estables, que habían sufrido un síndrome coronario agudo con anterioridad (al menos un año antes de su incorporación al estudio, tiempo durante el cual no debían haber sufrido ningún otro evento coronario), y que llevaban vida normal con su tratamiento habitual. Tanto los voluntarios sanos como los pacientes estables presentaban una distribución de sexo y edad sin diferencias significativas respecto al grupo de pacientes con SCA. El estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y cuenta con la aprobación del comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz y de la Fundación Hospital de Alcorcón. Se recogieron 28 ml de sangre por extracción de cada paciente y voluntario sano en tubos estériles con EDTA (Venoject, Terumo Europe), que fueron centrifugados a 750g (GS-6R, Beckman Coulter) durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma, que se guardó en alícuotas a -80°C hasta su uso.

Media de edad	60.0 años (50.3-68.5)
Sexo (hombre / mujer)	67%/33%
Fumadores actuales	39%
Hipertensión	44%
Diabetes	22%
Hiperlipidemia	77%
Obesidad / Sobrepeso	28%/33%
Historial familiar de EC temprana	28%
Colesterol total	215 (194-225)
LDL	142 (127-158)
HDL	39 (34-44)
Triglicéridos	159 (129-202)
Índice de masa corporal	28.4 (25.3-32.86)
SCA previos	11%
Estatinas	6%
Terapia antitrombótica	6%

Tabla TM_01: Características basales de los pacientes con SCA. Los datos cuantitativos se expresan como medianas (rango intercuartil). El tratamiento con estatinas y terapia antitrombótica se refieren a los tratamientos recibidos por los pacientes anteriormente al evento actual. SCA: Síndrome Coronario Agudo; EC: Enfermedad Coronaria.

Por su parte, el precipitado celular se utilizó para obtener las células mononucleares de sangre periférica (“peripheral blood mononuclear cells”, PBMC) a partir de las cuales se aislaron los monocitos según se describe a continuación.

2.Aislamiento de monocitos

El precipitado celular se resuspende en un volumen equivalente de tampón FACS FLOW (Becton Dickinson) y la mezcla se deposita sobre 10 ml de Ficoll para realizar una centrifugación en gradiente (durante 30 min. a 700g).

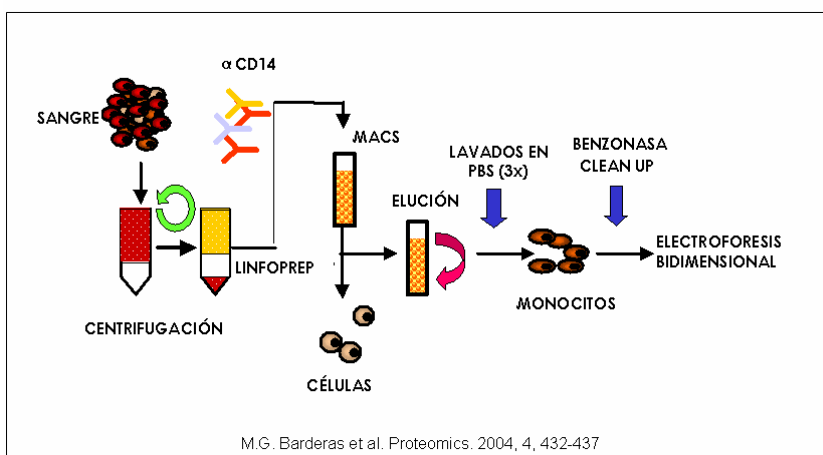


Figura M_02: Diagrama ilustrativo del método de aislamiento de monocitos empleado para el análisis mediante 2-DE, que evita la contaminación con otras células sanguíneas o proteínas plasmáticas (albúmina e inmunoglobulinas).

Así, las células rojas y las células polimorfonucleares de la sangre, que son más densas, se depositan en el fondo del tubo, mientras que las células mononucleares de sangre periférica (fundamentalmente linfocitos y monocitos) se depositan sobre el Ficoll formando una banda en la interfase. Las células mononucleares extraídas de la interfase se lavan tres veces con tampón FACS FLOW y finalmente con tampón fosfato salino (PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ y 1.75mM KH₂PO₄, pH 7.2), resuspendiendo en un volumen final de 80µl, a los que se añaden 20µl de anticuerpo monoclonal anti-CD14 acoplado a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). La mezcla se incuba durante 15 min. a 4°C en el mismo tampón y, a continuación, se hace pasar a través de un sistema de separación de células magnético (“autoMACS”, Miltenyi Biotec). De este modo, las células CD14⁺ (monocitos) marcadas magnéticamente son retenidas en la columna mientras que el resto de células salen directamente. Finalmente, las células CD14⁺ magnéticamente retenidas se obtienen aisladas como fracción positiva retirando el campo magnético y usando de nuevo PBS como tampón de elución (figura M_02). La eficacia del aislamiento magnético se evalúa mediante citometría de flujo [21, 67].

3. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma

Para realizar la depleción de las proteínas mayoritarias del plasma, utilizamos el sistema “Multiple Affinity Removal System” (Agilent Technologies). Este sistema está basado en una columna de afinidad (Multiple Affinity Removal Column 4,6mm x 50mm, Agilent Technologies) capaz de retener las seis proteínas más abundantes del plasma (albúmina, IgG, IgA, haptoglobina, transferrina y antitripsina), ya que contiene una serie de anticuerpos policlonales con especificidad para estas proteínas en cantidades proporcionales a la concentración de dichas proteínas en el plasma. Dos tampones comerciales (“Tampón A” y “Tampón B”), optimizados para asegurar la reproducibilidad y prolongar la vida de la columna, completan el sistema.

Para evitar la saturación de la columna, 15-20 µl de plasma humano se diluyen 1:5 en “Tampón A” (Agilent Technologies) y el plasma diluido se filtra por centrifugación (con filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm), para eliminar partículas que pudiesen obstruir la columna o los capilares del sistema cromatográfico. A continuación, la muestra se inyecta en un sistema cromatográfico de alta resolución (ÄKTApurifier, GE Healthcare) acoplado a la columna de afinidad múltiple mencionada. Se emplean como fases móviles el “Tampón A” (Agilent Technologies), un tampón fosfato de pH neutro

que utilizamos para cargar la muestra, lavar y equilibrar la columna; y el “Tampón B” (Agilent Technologies) con urea y a pH ácido, para facilitar la liberación de las proteínas retenidas en la columna. Los pasos cromatográficos se llevan a cabo según las indicaciones de la casa comercial. Resumidamente, se cargan 100 μ l de la muestra diluida y filtrada con Tampón A, aplicando un flujo de 0,25 ml/min, durante 9 min. La fracción no retenida, que habitualmente eluye entre los minutos 1,5 y 4,5 se recoge y almacena. Después se eluye la fracción retenida (que también se recoge y almacena) con un flujo de Tampón B de 1 ml/min durante 3,5 min. Seguidamente se regenera la columna, equilibrándola de nuevo con Tampón A durante 7,5 min., completando un ciclo total de 20 min. (figura M_03). Durante todo el proceso es necesario controlar que la presión del sistema no supera el límite de la columna (120 bar).

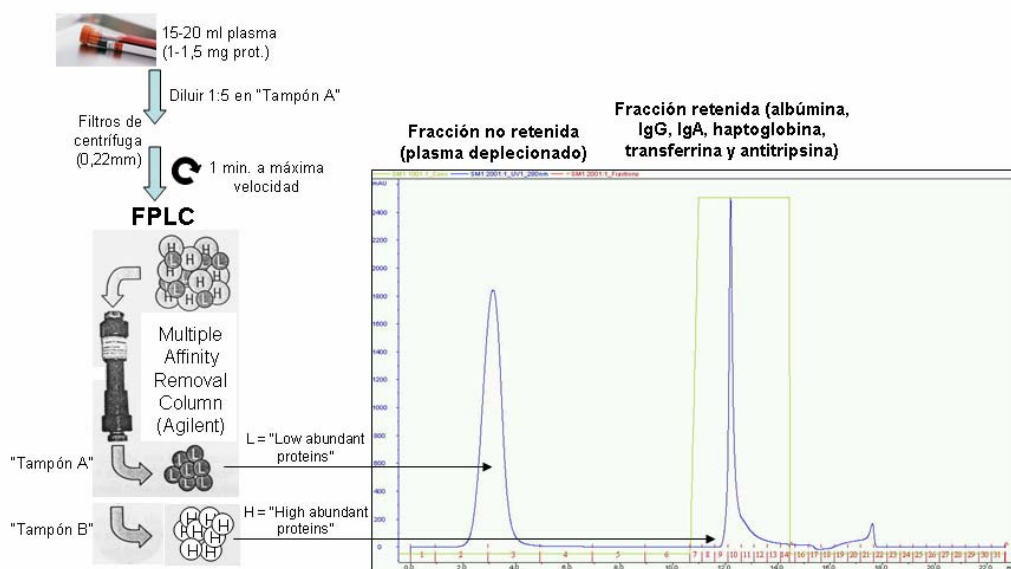


Figura M_03: Esquema representativo del procedimiento de separación específico de las proteínas mayoritarias del plasma con el sistema “Multiple Affinity Removal System” (Agilent Technologies). La muestra diluida se filtra por centrifugación antes de ser inyectada en un sistema FPLC (ÄKTApurifier, Amersham Biosciences) acoplado a la columna de afinidad múltiple. La muestra entra en la columna con un flujo lento de “Tampón A” (que favorece las interacciones de las proteínas con los anticuerpos), donde las proteínas mayoritarias (H) quedan retenidas mientras que las minoritarias (L) eluyen en el primer pico cromatográfico. A continuación las proteínas retenidas (H) son liberadas con un flujo de “Tampón B”, constituyendo el segundo pico cromatográfico.

Tras cinco ciclos cromatográficos (que equivalen a 100 μ l de plasma) para cada muestra, las fracciones retenidas y las no retenidas que se han recogido por separado se pasan a tubos concentradores independientes (Vivaspin 5kDa cut-off spin concentrators, Vivascience AG), que son centrifugados seguidamente a 2500-3000g en un rotor basculante (GS-6R Centrifuge, Beckman Coulter) durante 30 min. A continuación se deben eliminar los restos de “Tampón A”, pasando las muestras concentradas a un

tampón con bicarbonato amónico 25 mM, benzamidina 0.5mM y EDTA 0.5mM, para lo cual se realizan 3 lavados en los mismos tubos concentradores. Dichos lavados consisten en añadir 3-4 ml del tampón y concentrar de nuevo por centrifugación hasta unos 0,5 ml cada vez. Finalmente, se recogen las muestras concentradas y equilibradas en el tampón bicarbonato, se cuantifican por el método de Bradford [202] y se guardan alícuotas de 250 µg de proteína en tubos de 1,5 ml a -80°C para ser posteriormente liofilizadas durante 15-18h.

4.Electroforesis bidimensional

4.1. 1ª dimensión: Isoelectroenfoque.

4.1.1.Monocitos

Se solubilizan las células (10^7) en 200µl de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, 4% p/v CHAPS, 1% p/v ditiotreitól (DTT) y 2% v/v anfolitos) y los extractos resultantes se guardan congelados a -80°C hasta su uso. Llegado ese momento, las muestras son sonicadas durante 1 min. a temperatura ambiente, calentadas a 80°C durante 5 min. y finalmente incubadas a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se añaden 20µl de Benzonasa (Novagen) para eliminar los ácidos nucleicos y se incuba de nuevo durante 50 min. a temperatura ambiente, tras lo cual se realiza una precipitación con 5 volúmenes de acetona fría durante 15 min., seguida de una centrifugación a 1500g durante 5 min. Finalmente, las muestras son cuantificadas mediante el método de Bradford [202].

Las muestras proteicas (200-250µg) se diluyen en 350 µl un tampón de rehidratación compuesto de urea 8 M, 0.5% p/v CHAPS, 10mM DTT y 0.2% v/v anfolitos (“Pharmalyte” pH 4-7) y trazas de azul de bromofenol. Con esta mezcla, se rehidratan activamente las tiras IPG de 17cm (Ready Strip IPG Strips, Bio Rad) de pH 4-7, a 30 V durante 12 h y a 20°C, en una unidad “Protean IEF Cell” (BioRad) [67]. El isoelectroenfoque se desarrolla a continuación en el mismo aparato y a la misma temperatura, según el siguiente programa: 1 h a 500 V, 1 h a 1000 V, 30 min. a 8000 V (en gradiente), hasta 50000 V/h totales (figura M_04A).

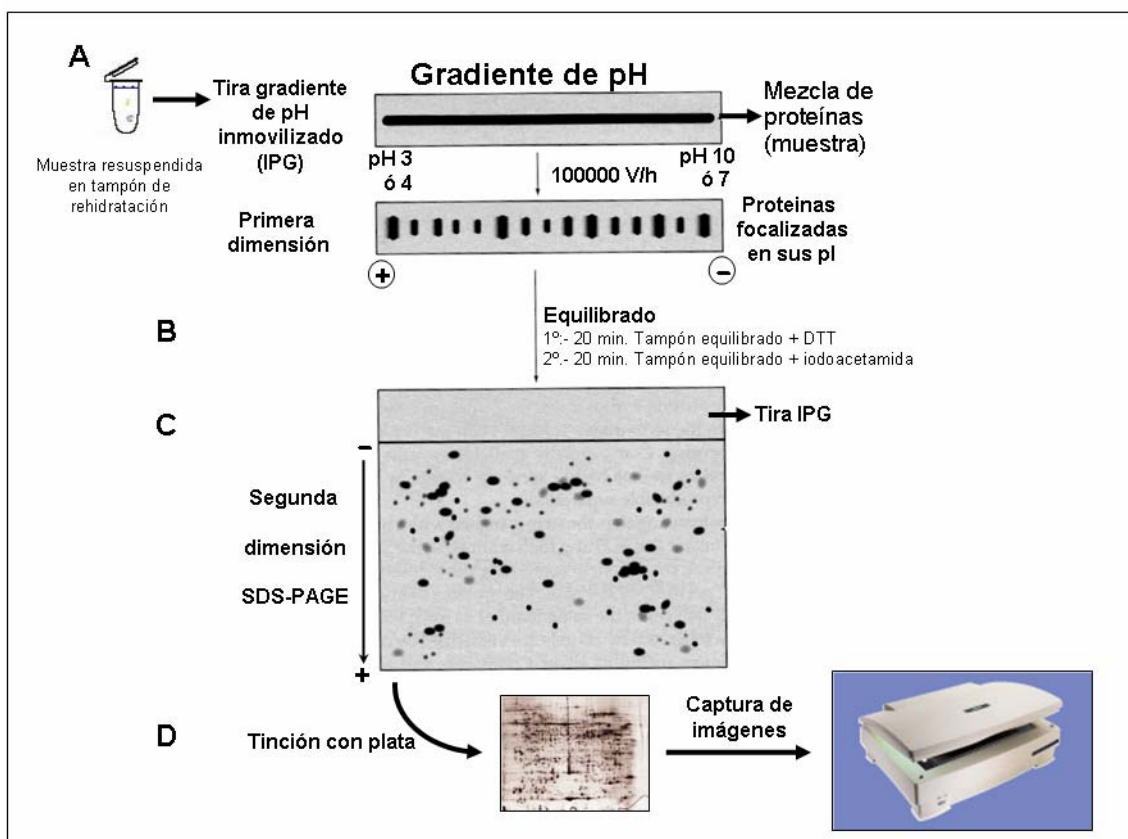


Figura M_04: Resumen del protocolo de electroforesis bidimensional convencional (2-DE) utilizado. **(A)** 1ª Dimensión: Isoelectroenfoque. **(B)** Equilibrado. **(C)** 2ª Dimensión: SDS-PAGE. **(D)** Tinción con plata y captura de imágenes.

4.1.2. Plasma

Las muestras liofilizadas (250 µg) se resuspenden en un tampón de rehidratación compuesto de urea 9 M, 4% p/v CHAPS, Tris base 10 mM, 1,2% v/v agente reductor (“DeStreak Reagent” GE Healthcare), 1% v/v anfolitos (“IPG buffer” pH 3-10 no lineal (NL) ó 4-7, GE Healthcare) y trazas de azul de bromofenol. El volumen de tampón utilizado en cada caso depende del tamaño de la tira gradiente de pH inmovilizado (IPG) que se quiera utilizar. Así, para rehidratar tiras de 18 cm las muestras se resuspenden en un volumen final de 350µl, mientras que se emplean 450µl del tampón de rehidratación para las tiras de 24 cm. Con esta mezcla se rehidratan las correspondientes tiras IPG (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare), de intervalo de pH 3-10 NL y/o 4-7 lineal, durante la noche en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare). Tras la rehidratación pasiva, se elimina el exceso de líquido dejándolo escurrir sobre un papel de filtro y a continuación se colocan las tiras en bandejas especiales de cerámica (Ettan IPGphor ceramic strip holders, GE Healthcare) que, a su vez, se sitúan en una unidad “IPGphor” (GE Healthcare) donde se

lleva a cabo el isoelectroenfoque a 20°C, según el siguiente programa: 30 min. a 300 V, 3 h a 3500 V (en gradiente), 3 h a 3500 V, 1,5 h a 6000 V (en gradiente), hasta 100000 V/h totales (figura M_04A).

4.2. Equilibrado.

Tras el isoelectroenfoque y previo a la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE, las tiras IPG deben ser equilibradas en un tampón adecuado para dicho procedimiento (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS y trazas de azul de bromofenol) [155]. El equilibrado se realiza en dos pasos (figura M_04B), empleando en cada uno 5 ml de solución de equilibrado por tira; en el primero de ellos se añade al tampón de equilibrado descrito anteriormente un 1% p/v de DTT, para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas. Las tiras se mantienen en esta solución durante 20 min. en agitación y a temperatura ambiente. Seguidamente se elimina el tampón, lavando las tiras con abundante agua bidestilada. A continuación, se realiza el segundo paso, en el que se añade un 2,5% p/v de iodoacetamida al tampón de equilibrado para evitar una posible reoxidación de las mismas. Se repite la incubación de 20 min. en agitación con esta otra solución y, tras el lavado con agua bidestilada, las tiras quedan listas para usar en la segunda dimensión.

4.3. 2ª dimensión: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

La segunda dimensión se realiza según Laemmli [149] con algunas modificaciones (figura M_04C). En el caso de los monocitos, se utilizó el sistema ProteanII XL (Bio Rad), preparando geles discontinuos de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) de 18 x 20 cm, al 12.5% de acrilamida. Para el plasma, se usó el sistema de electroforesis “Ettan DALTsix” (GE Healthcare), empleando también geles discontinuos en gradiente de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) de 24 x 20 cm. En este caso se utilizó piperazina diacrilamida (PDA) como agente de “entrecruzamiento” (“crosslinker”) en lugar de bisacrilamida, ya que este compuesto genera menor “ruido de fondo” al teñir con plata. Para elaborar los geles en gradiente 10-16% de acrilamida, se preparan dos soluciones (una “ligera”, al 10% y otra “pesada” al 16%) a partir de una disolución concentrada de acrilamida al 30% (p/v) y PDA al 0.8% (p/v). A cada solución se le añade Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, SDS 10% (p/v) y agua bidestilada para obtener la concentración de acrilamida deseada en cada caso. Se añaden también APS y TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización. Las

soluciones se transfieren a un sistema formador de gradientes conectado a la cámara de polimerización del sistema Ettan DALTsix (DALTsix Gel Caster, GE Healthcare), donde, para aumentar reproducibilidad, se polimerizan 6 geles a la vez (figura M_05). Una vez preparados los geles, cada tira IPG se coloca sobre la superficie de un gel, evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal base. Para fijar ambos geles y evitar pérdidas de proteínas cuando éstas migran de un gel a otro, se añade una solución de agarosa 0,5% (p/v). La electroforesis tiene lugar a 25°C, aplicando en primer lugar 5W/gel durante 30 min., seguido de 18 W/gel durante 5-6 h.

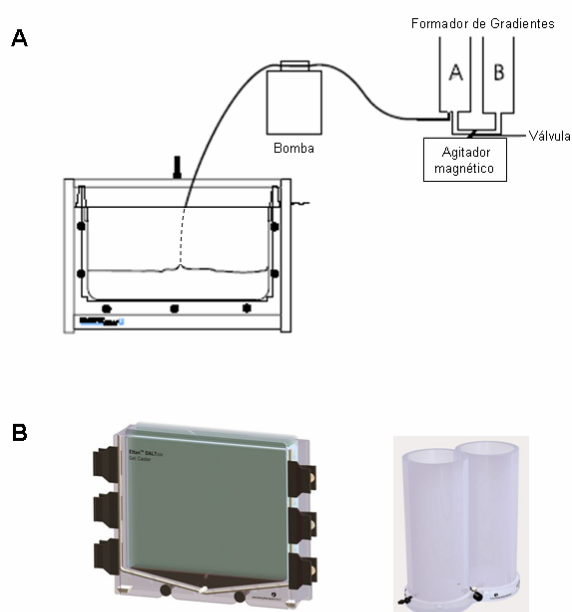


Figura M_05: **(A)** Representación esquemática del método utilizado para la preparación de los geles de poliacrilamida en gradiente. Antes de comenzar a llenar la cámara de polimerización, las soluciones ligera (10%) y pesada (16%) se transfieren a un sistema formador de gradientes. Si la cámara se llena de arriba a abajo (como en el esquema), la solución pesada debe colocarse en el vaso “A” del sistema formador de gradientes, (con el agitador magnético en funcionamiento y cerrada la válvula que comunica las cámaras) y la solución ligera en el vaso “B”. Si la cámara se llena de abajo a arriba (como ocurre con el sistema Ettan DALTsix Gel Caster), las soluciones se colocan a la inversa (la ligera en el vaso “A” y la pesada en el “B”). Una vez preparado todo el sistema, se abre la válvula y se transfiere la acrilamida a la cámara de polimerización con la ayuda de una bomba peristáltica. **(B)** Imagen de los componentes del sistema Ettan DALTsix (DALTsix Gel Caster y DALTsix Gradient Maker) utilizados para preparar todos los geles en gradiente.

5. Tinción con plata y captura de las imágenes

Para visualizar las proteínas tras la segunda dimensión, los geles son teñidos con un kit comercial de tinción con plata, basado en el método de Heukeshoven y Dernick [203] (Silver Staining Kit, GE Healthcare). Durante cada etapa del protocolo de tinción los geles permanecen sumergidos en 250 ml de la correspondiente solución, en recipientes de tamaño adecuado, que se mantienen en agitación a lo largo de todo el proceso sobre un agitador orbital.

Al finalizar la electroforesis, los geles se sumergen en solución de fijación (30% v/v etanol y 5% v/v ácido acético) y se incuban a temperatura ambiente durante toda la

noche. A continuación se realizan 3 lavados de 5 min. cada uno con agua bidestilada antes de aplicar la solución de sensibilización (30% v/v Etanol, 5% v/v tiosulfato sódico y 6.8% p/v acetato sódico) durante 30 min., tras lo cual se vuelven a realizar otros 3 lavados con agua bidestilada, esta vez de 10 min. cada uno. Entonces los geles se incuban 20 min. con una solución de nitrato de plata 2.5% (v/v) y finalmente, tras dos pasos cortos de lavado (1 min/lavado) con agua bidestilada, se llevó a cabo el revelado, incubando los geles con una solución que contiene 2.5% (p/v) carbonato sódico y 37% (p/v) formaldehído (añadido justo antes de usar). Tras 10 min. la reacción de revelado se detiene incubando durante otros 10 min. con solución de parada (14.6 % p/v EDTA- Na_2). Los geles se conservan en agua bidestilada hasta la digitalización de las imágenes.

Las imágenes de los geles son digitalizadas (figura M_04D) mediante un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) y exportadas en formato TIFF con una resolución de 300 ppp (puntos por pulgada), para importarlas a continuación al programa “PDQuest 2-D Analysis Software” (Bio-Rad), versión 8.0.1, con el que se realiza el procesamiento de las imágenes y el análisis bioinformático. Tras la digitalización, todos los geles empleados se almacenaron en bolsas de plástico con agua bidestilada a 4°C.

6. Tinción con Azul de Coomassie

En determinados casos se empleó la tinción con azul de Coomassie que es más rápida y compatible con la espectrometría de masas, pero mucho menos sensible. Se emplearon dos protocolos de tinción diferentes, según el caso.

6.1. Tinción “clásica”.

Al terminar la electroforesis, los geles se sumergen en una solución 41 % v/v metanol, 7 % v/v ácido acético glacial y 0.016 % p/v Coomassie Brilliant Blue (R-250) y se incuban a temperatura ambiente y en agitación durante al menos 1h (habitualmente se deja toda la noche). A continuación, se incuban en las mismas condiciones en una solución de desteñido (26 % v/v metanol y 6 % v/v ácido acético) durante 1-2h. Finalmente, los geles se conservan en agua bidestilada.

6.2. Tinción con Coomassie coloidal.

Finalizada la electroforesis, se realiza un primer paso de fijación, incubando los geles en una solución 50 % v/v etanol y 2 % v/v ácido fosfórico en agitación durante al menos 3h (habitualmente se deja toda la noche) a temperatura ambiente. A continuación

se realizan 3 lavados con agua bidestilada de 10 min cada uno, tras los cuales se incuban los geles en una segunda solución 17% p/v sulfato amónico, 3% ácido fosfórico y 33% metanol en las mismas condiciones que los pasos anteriores durante 1h. Se añaden entonces a la solución anterior 330 mg de Coomassie Blue G-250 resuspendidos previamente en 5 ml de metanol y se deja incubar toda la noche. Finalmente, se realiza un paso de desteñido incubando los geles en agua hasta alcanzar el contraste adecuado.

7. Electroforesis bidimensional diferencial (DIGE)

7.1. Marcaje de las muestras.

En este caso, antes de la preparación de la muestra para el isoelectroenfoque, es necesario marcar covalentemente las proteínas de las muestras de plasma deplecionado con el fluorocromo correspondiente. Para ello, se resuspenden las muestras liofilizadas en 50 μ l de un tampón de marcaje a pH 8.5, compuesto por urea 7 M, tiourea 2M, 4% p/v CHAPS y Tris base 30 mM (quedando cada muestra a una concentración final de 5 mg/ml). Para que la reacción de marcaje se produzca adecuadamente es necesario que el pH de las muestras se encuentre entre 8.0 y 9.0 por lo que, una vez resuspendidas en este tampón, es necesario comprobar que el pH de cada muestra continúa dentro de este rango, aplicando 2-3 μ l de cada muestra sobre varillas indicadoras de pH Neutralit (pH 5,0 - 10,0). Además, es necesario evitar la adición de aminas primarias como anfólitos o tioles (por ejemplo, DTT) antes de finalizar el proceso de marcaje, ya que disminuyen su rendimiento. Los fluorocromos, que se suministran como polvo sólido y deben haber sido previamente reconstituídos en dimetilformamida anhidra (Sigma-Aldrich), originando una solución madre a una concentración de 1mM, son diluidos (de nuevo en dimetilformamida) hasta la concentración de la solución de uso (400pmol/ μ l). Tras resuspender las muestras que se van a incluir en el experimento (figura M_06A), se preparan alícuotas de 50 μ g (10 μ l) de cada muestra, a las que se añaden 400 pmol (1 μ l) del fluorocromo correspondiente (Cy3 ó Cy5, según el diseño experimental). Además se debe preparar un control interno que incluya todas las muestras del experimento, para lo cual se ponen en un único tubo 10 μ l (50 μ g) de cada una de ellas y esta mezcla se marca con Cy2 (añadiendo 400 pmol del fluorocromo por cada 50 μ g de muestra que se quieran marcar). Las muestras se incuban entonces en hielo durante 30 min. en oscuridad, para permitir la reacción de marcaje. Dicha reacción se detiene

añadiendo 1 μ l de lisina 10 mM por cada 50 μ g de muestra e incubando de nuevo en hielo durante 10 min. y en oscuridad.

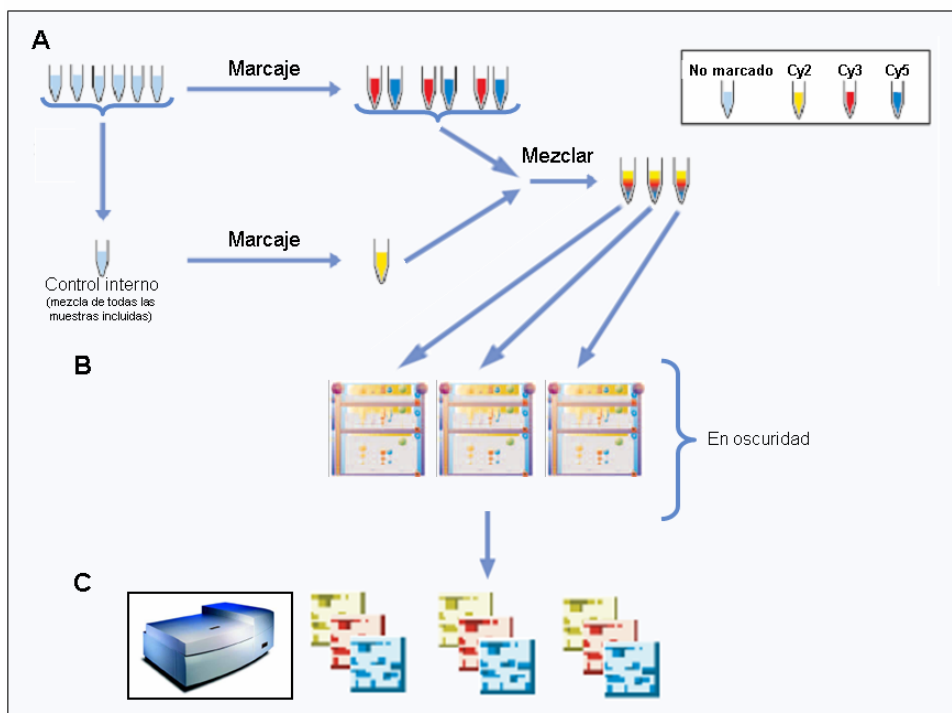


Figura M_06: Resumen del protocolo de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) utilizado. (A) Marcaje de las muestras. (B) Electroforesis bidimensional. (C) Captura de imágenes.

7.2. Electroforesis bidimensional.

Una vez que han sido marcadas, las tres muestras correspondientes a un mismo gel (según el diseño experimental) deben mezclarse en un único tubo antes de añadir el tampón de rehidratación anteriormente descrito para realizar el isoelectroenfoque (figura M_06B). Puesto que los fluorocromos utilizados son compuestos fotosensibles, los siguientes pasos se deben realizar según se indica en el apartado 4 (Electroforesis bidimensional), pero en oscuridad.

7.3. Captura de imágenes.

Las imágenes de los gels 2D-DIGE son digitalizadas empleando un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare), obteniendo las imágenes emitidas por cada fluorocromo por separado (aplicando las longitudes de onda de excitación y emisión específicas de cada fluorocromo) con una resolución de 100 μ m (figura M_06C). Las imágenes son entonces importadas a los diferentes módulos del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare), versión 6.5, con el que se realiza el procesamiento y análisis estadístico de las imágenes. Tras la

digitalización los geles se tiñen con azul de Coomassie o con plata y se conservan en bolsas de plástico con agua bidestilada a 4°C.

8. Análisis de las imágenes

8.1. Geles teñidos con plata.

El análisis de los geles bidimensionales (o mapas proteicos) se realiza empleando el programa PDQuest 2-D Analysis Software (Bio-Rad) versión 6.2 en el caso de los monocitos y versión 8.0.1 en el caso del plasma (figura M_07). Las imágenes importadas a este programa se depuran y optimizan mediante un filtrado previo al análisis (empleando la opción “sal y pimienta” gaussiana de 9 x 9). A continuación, se crea un archivo “experimento”, en el que el programa incluye todos los geles que se vayan a comparar para detectar a continuación las manchas proteicas existentes en cada gel y emparejarlas con las correspondientes manchas en el resto de los geles. Este proceso requiere una revisión manual pormenorizada y, en ocasiones, la edición y corrección de alguna de las manchas o de los emparejamientos detectados automáticamente. A continuación el programa densitometra las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. Para compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción en los diversos niveles de concentración en cada gel, se aplica el método de normalización más sofisticado de que disponemos con PDQuest mediante la opción “Local Regression Model”. Este método calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos sus puntos y que sirve para calcular el factor de normalización para cada mancha. Por último, se establecen las “réplicas de grupo” (indicando al programa qué geles pertenecen a un mismo grupo de análisis) y se realiza un análisis cuantitativo y otro estadístico mediante una prueba t-Student, para comparar la expresión diferencial de las manchas entre los diferentes grupos. Solo se consideran significativas aquellas manchas con valores $p < 0.05$ y con unos niveles de expresión alterados en $\pm 30\%$.

Los datos obtenidos mediante PDQuest son exportados a una hoja de cálculo Excel, donde se les da el formato adecuado para volver a analizarlos mediante el programa SPSS v.13.0, que nos permite realizar la prueba de ANOVA, que nos permite comparar las medias de una misma variable en más de dos grupos, cuando existe normalidad en la distribución de los datos y homogeneidad en las varianzas muestrales. En primer lugar se realiza la prueba de Kolmogorov-Smirnov, que nos permite

Materiales y Métodos

comprobar la distribución Normal de las variables analizadas. A continuación se realiza la prueba de Levene, para comprobar la homogeneidad de las varianzas, y en aquellas variables en que se cumple esta premisa, se realiza la prueba de ANOVA, seguida de un análisis post-Hoc (prueba de Scheffé). En aquellos casos en que no se cumple la homogeneidad de varianzas, se realiza la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn, mediante otro programa estadístico (GraphPAD Instat). Se consideran muchas diferencialmente expresadas aquellas que presentan un valor $p < 0.05$.

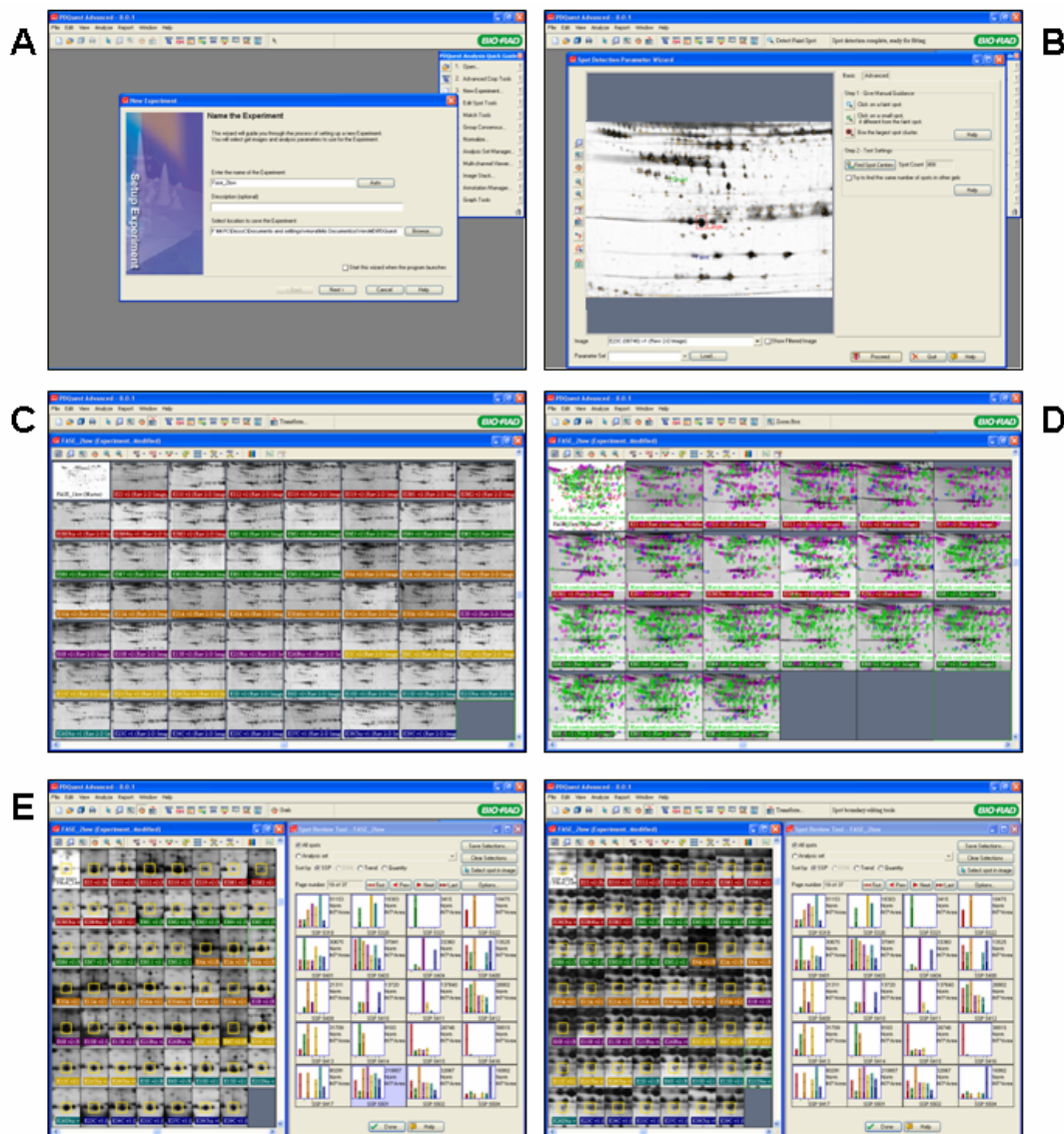


Figura M_07: Representación del proceso de análisis mediante el programa PDQuest 2-D Analysis Software v 8.0.1 (Bio-Rad). (A) Creación de un nuevo experimento. (B) Detección de manchas. (C) Visita general del experimento. (D) Emparejamiento de las manchas (las marcas verdes, rosas y azules equivalen a las marcas que el programa genera para señalar manchas equivalentes en todos los geles). (E) Ejemplos del resultado obtenido tras el análisis de expresión para cada mancha.

8.2. Geles 2D-DIGE.

El análisis de las imágenes digitalizadas de los geles 2D-DIGE se realiza empleando el programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare), versión 6.5 (figura M_08). Se trata de una aplicación informática de análisis automático de imagen que consta de varios módulos (Image Loader, DIA (Differential In-gel Analysis), BVA (Biological Variation Analysis), EDA (Extended Data Analysis) y XML Toolbox), cada uno de los cuales desempeña una función en el análisis de las imágenes digitalizadas de los geles 2D-DIGE. Mediante el módulo “Image Loader”, se genera un proyecto en el que se incluyen las imágenes de los geles, haciéndolas accesibles al resto de los módulos. A continuación, todos los mapas proteicos de un mismo proyecto se analizan mediante el módulo “DIA (Differential In-gel Analysis)”, que detecta y cuantifica las manchas proteicas de las tres imágenes (Cy2, Cy3, Cy5) correspondientes a cada gel. El algoritmo que emplea este módulo para la detección de las manchas se basa en la co-detección de las tres señales fluorescentes (2 muestras y 1 control interno) y permite diferenciar las señales de manchas verdaderas de los artefactos del gel. Por su parte, la cuantificación se basa en el cálculo de las relaciones entre las señales fluorescentes Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2, lo que permite tener un valor de intensidad de fluorescencia normalizado para cada mancha. Una vez completada esta fase, los datos generados mediante DIA son importados al módulo “BVA (Biological Variation Analysis)”, que permite el emparejamiento de las manchas detectadas entre las imágenes de los diferentes geles del proyecto para obtener después datos estadísticos sobre los niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos de estudio. Se concluye que existe variación cuando los niveles de expresión están alterados en $\pm 30\%$ y dicha variación se considera estadísticamente significativa cuando se encuentra dentro del intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$) determinado por la prueba t-Student. Por último, los datos contenidos en los archivos generados por BVA se analizan en el módulo “EDA (Extended Data Analysis)” que ofrece un análisis estadístico avanzado mediante diversos métodos de cálculo que se dividen en cuatro grupos principales:

- Análisis de Expresión Diferencial (“Differential Expression analysis”) como el test T-Student y el Análisis de la varianza (ANOVA), que se usa no sólo para encontrar manchas que muestren cambios significativos en sus niveles de expresión, sino también para reducir el conjunto de datos, por ejemplo limitándolo a estas proteínas.

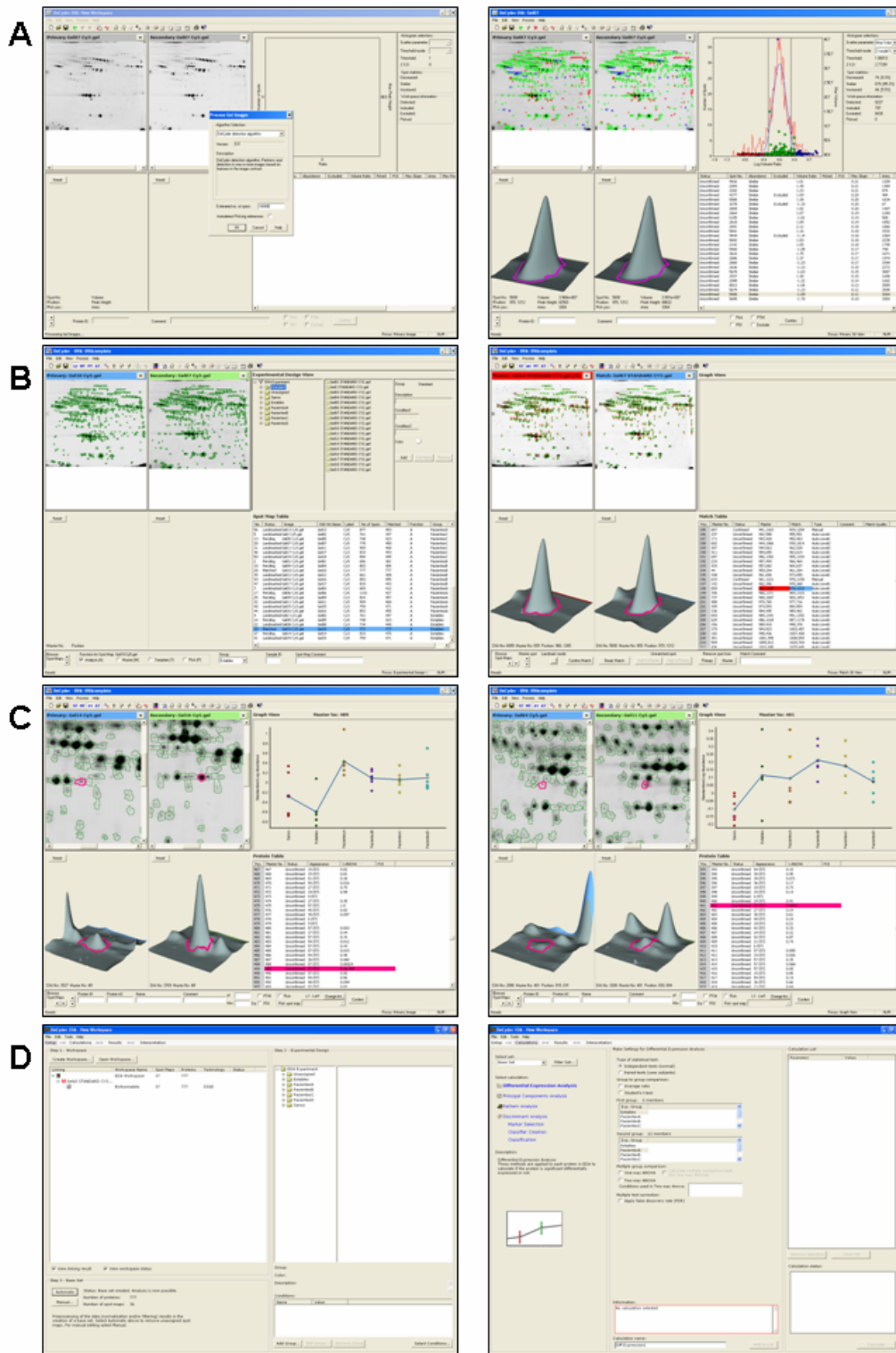


Figura M_08: Representación del proceso de análisis mediante el programa DeCyder Differential Analysis Software v. 6.5 (GE Healthcare). **(A)** Detección de manchas en el módulo DIA. **(B)** Definición del experimento (izquierda, “Spot Map Table”) y emparejamiento de las manchas (derecha, “Match Table”) en el módulo BVA. **(C)** Ejemplos del resultado obtenido tras el análisis de expresión para cada mancha en el módulo BVA. **(D)** Ventana de creación de experimento (izquierda) y ventana de cálculos (derecha) en el módulo EDA.

- Análisis de Componentes Principales (“Principal Component analysis”), que nos da una perspectiva general de los datos obtenidos y puede usarse para encontrar valores extremos o atípicos dentro de los mismos.
- Análisis de Patrones de Expresión (“Pattern analysis”), que permite encontrar patrones en las variaciones de expresión y perfiles de expresión diferencial
- Análisis Discriminante (“Discriminant analysis”), que busca las manchas proteicas que permiten discriminar entre los diferentes grupos de estudio (para encontrar candidatos a biomarcadores) y también puede crear “clasificadores” capaces de asignar una muestra a un grupo determinado en función de los perfiles de expresión.

En nuestro caso realizamos el Análisis de Expresión Diferencial para poder trabajar con un conjunto de datos reducido que incluyese sólo aquellas manchas con un valor $p < 0.05$ en la prueba de ANOVA y con unos niveles de expresión alterados en $\pm 30\%$ (es decir, las manchas que consideramos diferencialmente expresadas). Con ese conjunto de datos se realiza el Análisis de Componentes Principales y a continuación tres tipos de Análisis de Patrones (clasificación jerárquica, clasificación de k-medias y clasificación mediante mapas auto-organizativos).

8.2.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es un método estadístico cuyo objetivo es la simplificación y reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos con numerosas variables, de tal manera que los datos transformados mantengan las características básicas de los datos iniciales sólo con una pequeña pérdida de información [204]. En otras palabras, se trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. De esta forma se obtiene una imagen simplificada del conjunto de datos inicial, que sigue describiéndolos en su mayor parte, pero que resulta mucho más sencilla a la hora de interpretarlos.

Para realizar el ACP partimos de una matriz de datos (X) con N filas (observaciones) y K columnas (variables). Esta matriz se representa en un espacio con tantas dimensiones como variables (K dimensiones), en donde cada variable representaría un eje de coordenadas. Cada observación se representaría como un punto en ese espacio multidimensional, formando una nube de puntos. Sobre este espacio, el ACP define nuevas variables que recogen la mayor parte de la información (que identificamos con la varianza) contenida en las variables originales. Cada nueva

variable sería un nuevo eje de coordenadas en el cual el valor de cada observación sería la proyección del punto sobre dicho eje [205]. El ACP buscará los ejes más adecuados, que serán aquellos sobre los que se proyecte una mayor cantidad de varianza. Estos ejes (que llamaremos componentes principales) serán una combinación lineal de las variables originales y deben ser independientes entre sí. El valor de la proyección de cada observación en el nuevo eje de coordenadas se conoce como “puntuación” (score). Normalmente, un único componente principal es insuficiente para representar un conjunto grande de datos, por lo que suelen calcularse dos o más. El primero de ellos es el que recogerá la mayor parte de la información (varianza), el segundo recogerá la segunda mayor parte y así sucesivamente. La representación de las proyecciones de las observaciones en los nuevos ejes de coordenadas (componentes principales) se conoce como “gráfico de puntuación” (score plot). Pero el ACP no sólo nos aporta información sobre las observaciones, sino también sobre las variables. Los “valores de contribución” (loadings) proporcionan una perspectiva de la influencia de las variables originales en los componentes principales. Estos valores se representan en el “gráfico de contribución” (loading plot), que nos indica qué variables están correlacionadas, cuáles son influyentes y cuáles son responsables de los patrones detectados en las observaciones. De este modo, cuando la correlación es directa, las variables se agrupan en la misma región del “gráfico de contribución” y cuando están inversamente correlacionadas se sitúan en cuadrantes opuestos. La distancia con el origen del gráfico también influye (cuanto más alejada respecto del origen, más impacto tiene la variable sobre el modelo). Es necesario tener en cuenta que este tipo de análisis es extremadamente sensible a la presencia de “valores extremos o atípicos” (conocidos como “valores fuera de control” o “outliers”), observaciones extremas que no encajan en el modelo de componentes principales calculado. Se trata de casos complicados, ya que pueden alterar los resultados del ACP, pero también pueden ser muy interesantes si lo que se está buscando son datos marcadamente diferentes. Los valores extremos o atípicos son fáciles de detectar, ya que el “gráfico de puntuación” muestra una elipse que representa un intervalo de confianza del 95% para las observaciones que se ajustan a la normalidad multivariante. Podemos aceptar que las observaciones que aparecen fuera de la elipse no se ajustan a la distribución normal y serán consideradas “valores extremos o atípicos”.

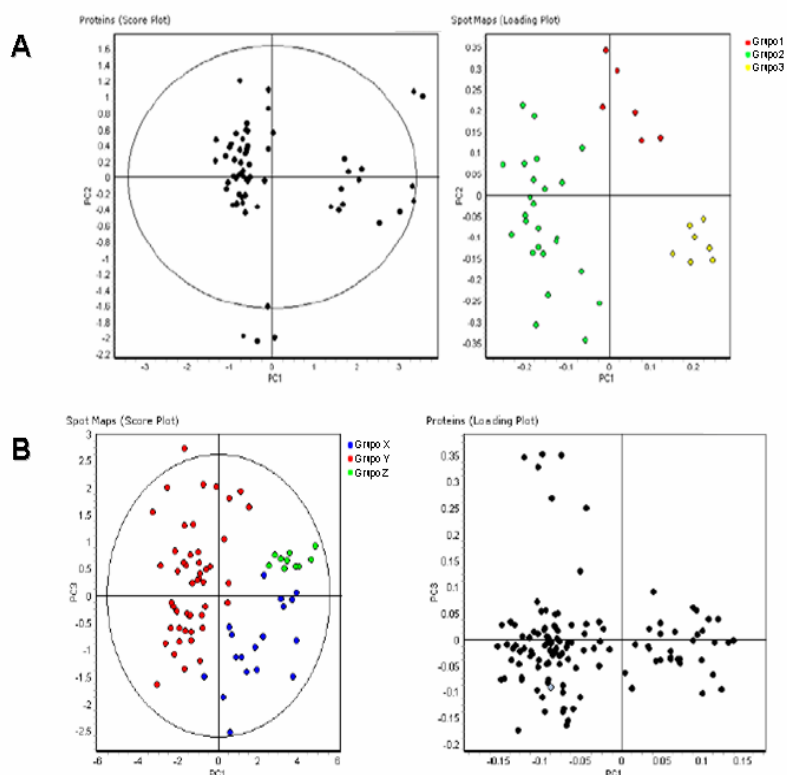


Figura M_09: Ejemplo de un Análisis de Componentes Principales (ACP) realizado mediante el módulo EDA del programa DeCyder. **(A)** Resultados del ACP calculados tomando como variables los mapas proteicos. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) se muestran las manchas proteicas y en el “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) aparecen representadas los mapas proteicos. **(B)** Resultados del ACP calculados tomando como variables las manchas proteicas. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) se muestran los mapas proteicos y en el “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) aparecen representadas las manchas proteicas.

En el módulo EDA de DeCyder, podemos seleccionar el número de componentes principales que queremos calcular. Además, podemos tomar como variables los patrones bidimensionales (o mapas proteicos de las muestras) y como observaciones las manchas proteicas, o a la inversa (las manchas proteicas como variables y las muestras como observaciones). Los resultados en ambos casos (figura M_09) se muestran en el “gráfico de puntuación” (score plot) y el “gráfico de contribución” (loading plot). Si tomamos como variables las muestras (figura M_09A), lo que pretendemos es reducir su complejidad para obtener una visión más simple de las manchas proteicas (que aparecerán representadas en el “gráfico de puntuación”). En este caso, los valores extremos o atípicos pueden ser manchas proteicas que estén mal emparejadas (lo que no es posible en nuestro caso, ya que todas las manchas que mostraron diferencias significativas habían sido revisadas una a una previamente), o bien manchas con una expresión diferencial muy marcada (que, por el contrario, serían muy interesantes). En cambio, si tomamos las manchas proteicas como variables (figura M_09B), lo que pretendemos es reducir su complejidad para conseguir una visión más simple de las muestras (que aparecerán representadas en el “gráfico de puntuación”). En este análisis, aquellas que presenten perfiles de expresión similares y, por tanto, las pertenecientes a un mismo grupo experimental, deberían aparecer próximas en el “gráfico de

puntuación”. Cuando esto no ocurre indica que existe algún problema con la muestra en cuestión, especialmente cuando aparece representada fuera de la elipse que delimita el intervalo de normalidad. Por ello, este análisis se usa principalmente para encontrar estos valores extremos o atípicos en las muestras y excluirlas del estudio.

8.2.2. Análisis de Patrones

El análisis de patrones, también llamado análisis de grupos (o análisis de “cluster”) es una clasificación no supervisada que se basa en varias técnicas estadísticas multivariantes [205-207]. Se dice que un método de clasificación es “no supervisado” cuando se desconoce el número de clases en que es razonable dividir las observaciones, así como a qué clase pertenece cada observación. Su finalidad, por tanto, es dividir un conjunto de observaciones o datos en grupos, de forma que los perfiles de los objetos en un mismo grupo sean muy similares entre sí y distintos de los perfiles de los objetos de grupos diferentes. Se trata pues de un proceso para agrupar objetos similares, para lo cual es necesario definir la similitud. Existen varios métodos matemáticos para estimar la similitud, dos de los cuales se incluyen en el análisis de patrones con el módulo EDA de DeCyder: la distancia Euclídea, que da más importancia a las medidas (en valores absolutos) de las variables y el coeficiente de Pearson, en el que tiene más valor la tendencia que las medidas de las variables.

Análisis de grupos jerárquico (clasificación jerárquica). Se denomina método jerárquico porque crea una jerarquía entre las clases que se construyen a partir de las observaciones. De este modo, dado un conjunto de datos inicial donde cada elemento es una clase, se genera un árbol jerárquico (o dendrograma) agrupando en cada etapa las dos clases ubicadas a mínima distancia. El programa nos permite realizar simultáneamente la ordenación jerárquica de las muestras y de las manchas proteicas, de modo que obtenemos los resultados en forma de dos dendrogramas que delimitan un espacio bidimensional en el que se representa un diagrama de calor semejante a los empleados en el análisis de expresión génica mediante chips de ADN (figura M_10). Se trata de un sistema de coordenadas que representa las manchas proteicas en el eje vertical y las muestras en el eje horizontal, de modo que cada coordenada del diagrama muestra mediante una escala de colores el nivel de expresión de una mancha proteica en una muestra concreta. La escala de colores que va del verde (expresión disminuida) al negro (sin cambios de expresión) y al rojo (expresión aumentada), se representa en la

esquina inferior izquierda de cada diagrama (el color gris aparece cuando una mancha está ausente en una muestra).

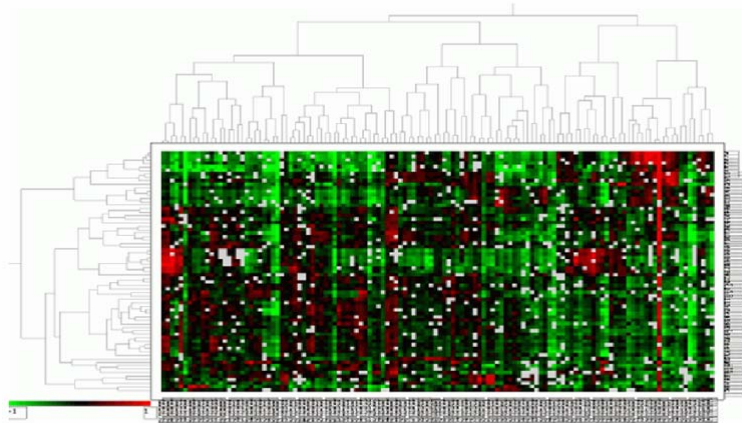


Figura M_10: Ejemplo de un diagramas de **calor** obtenido tras la clasificación jerárquica de los datos mediante el módulo EDA del programa DeCyder. El dendrograma horizontal muestra la clasificación de las muestras, mientras que el dendrograma vertical corresponde a las manchas proteicas.

- Análisis de grupos de k-medias (clasificación de k-medias). Es una herramienta diseñada para asignar los objetos a un número predeterminado de grupos (clusters o categorías), “K”, cuyas características no se conocen aún pero que se basan en un conjunto de variables especificadas, de modo que cada objeto pertenezca a una única categoría (figura M_11). El número predeterminado de grupos o categorías “K” puede ser un valor que le indiquemos al programa (si tenemos alguna noción del número de categorías en que deberían agruparse datos), aunque DeCyder tiene una opción que le permite estimar el número óptimo de grupos a calcular. El objetivo de este algoritmo es poner cada objeto en una categoría dependiendo de la similitud, que para este tipo de análisis en DeCyder siempre se mide mediante la distancia Euclídea. La calidad de los grupos encontrados se estima mediante el valor “q”, que varía del 1 al 100 (siendo 100 la mejor puntuación posible).

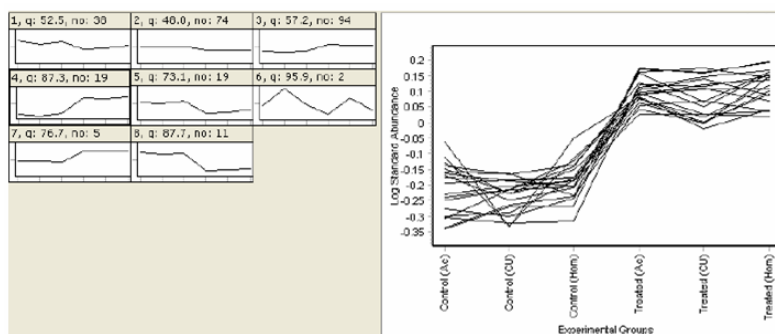


Figura M_11: Ejemplo de la representación de los resultados obtenidos tras la clasificación de los datos mediante el algoritmo de k-medias o los mapas auto-organizativos con el módulo EDA del programa DeCyder.

- Mapas auto-organizativos (“Self Organizing Maps”, SOM), que se basan en la técnica bioinformática de redes neuronales. Se trata de un método similar a K-medias (figura M_11), pero con la ventaja de que organiza los grupos en un mapa de dos dimensiones, donde los grupos vecinos muestran patrones de expresión

similares, ya que se encuentran próximos en la “capa de neuronas” y, por tanto, se comportan de forma semejante. Los resultados en EDA se muestran en el mismo esquema topológico que emplea el algoritmo, que en nuestro caso contenía 9 categorías, ya que los parámetros iniciales se ajustaron de modo que el programa emplease una red de 3x3 neuronas (el número de categorías se define como el número de neuronas en cada una de las dos dimensiones de la red neuronal). La calidad de los grupos se estima mediante el mismo parámetro que la clasificación de k-medias (valor “q”). En el caso de los mapas auto-organizativos, al igual que en la clasificación jerárquica, podemos realizar el análisis calculando la similitud según la distancia Euclídea y/o mediante el coeficiente de Pearson.

DeCyder dispone además del módulo “XML Toolbox”, con el que exportamos los datos generados en DIA y BVA a formatos adecuados para acceder a ellos mediante otras aplicaciones, generando archivos de texto o html.

9. Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas

9.1. Preparación de las muestras: Digestión trípica “en gel”.

Las manchas proteicas son escindidas manualmente del gel bidimensional y desteñidas en primer lugar, incubándolas en una solución de desteñido (ferrocianuro potásico 30 mM, tiosulfato sódico 100 mM), tras lo cual se lavan con agua bidestilada. A continuación se sumergen en acetonitrilo durante 5 min. y se repite tres veces, hasta conseguir la deshidratación y blanqueado total de los fragmentos de gel, que se lavan entonces con bicarbonato amónico 25 mM durante 5 min. Sin retirar el sobrenadante, se añade el mismo volumen de acetonitrilo y se secan mediante centrifugación a vacío en “speed vac”. Posteriormente, las manchas proteicas desteñidas son digeridas empleando el protocolo de digestión de Schevchenko et al. [208] con ligeras variaciones: las proteínas contenidas en los fragmentos de gel son reducidas y alquiladas incubando con DTT 10 mM en bicarbonato 50 mM durante 30 min., seguido de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante otros 30 min. Transcurrido ese tiempo, se lavan con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo, secándolos de nuevo a vacío en centrífuga “speed-vac”. Los fragmentos de gel se rehidratan en 15 µl de una solución de tripsina porcina modificada a una concentración de 12.5 ng/µl en bicarbonato amónico 50 mM, durante a 30 min. a 4°C. Se retira entonces el sobrenadante y se cubren los

fragmentos con bicarbonato amónico 50 mM, dejando transcurrir la digestión durante un mínimo de 6 h a 37°C. Por último, se centrifuga la muestra, se elimina el sobrenadante y se añade una solución de acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5% (v/v), que se sonica durante 10 min. para extraer los péptidos del gel. El sobrenadante obtenido finalmente, que contiene los péptidos tripticos, se recoge y se analiza directamente en un espectrómetro de masas.

9.2. Análisis de las muestras mediante Espectrometría de Masas (MS).

La mayor parte de las manchas proteicas de interés se identificaron empleando dos espectrómetros de masas diferentes: MALDI Ultraflex de Bruker-Daltonics y 4700 Proteomics Analyzer de Applied Biosystems, en dos Servicios diferentes (Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares – CNIC y Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense / Parque Científico de Madrid – UCM/PCM), mediante análisis con MALDI-TOF por huella peptídica (PMF), o bien MALDI-TOF/TOF, por secuenciación peptídica.

9.2.1. Identificación de proteínas (MALDI Ultraflex).

Se mezcla una alícuota (0.5µl) del digerido triptico descrito más arriba con una alícuota (0.5µl) de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 5 mg/mL en acetonitrilo acuoso al 33% (v/v) y 0,25% (v/v) de ácido trifluoroacético). La mezcla (1µl) se deposita en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip (Bruker-Daltonics) de 600 µm (que concentra la muestra en una superficie hidrofílica muy pequeña -600 µm- rodeada de una superficie hidrofóbica) y se deja cristalizar a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS y MALDI-MS/MS se obtienen de forma automática en un espectrómetro de masas (EM) MALDI Ultraflex (Bruker-Daltonics) equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS [209]. Los espectros de masas se miden en modo reflector positivo (analizándose iones cargados positivamente), a una frecuencia de láser de nitrógeno (337 nm) de 50 Hz, con un voltaje de aceleración iónica de 25 kV, un tiempo de retardo 140 ns y se acumulan entre 100 y 1000 espectros individuales. Para el análisis de iones fragmento en modo tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores son acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor son de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se lleva a cabo con el

software flexAnalysis (Bruker-Daltonics). Para obtener una mayor exactitud, los espectros MALDI-TOF se calibran internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con $m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$, lo que garantiza un error menor a 30 ppm en la masas peptídicas detectadas. La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realiza con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubre el intervalo $m/z = 800-3200$. Los datos de MALDI-MS y MS/MS se combinan mediante el programa BioTools (Bruker-Daltonics) y se eliminan los valores de masas contaminantes (tripsinas, queratinas, aductos de sodio o señales resultantes de la oxidación de metioninas), para buscar en una base de datos no redundante (NR; $\sim 4 \times 10^6$ entradas; National Center for Biotechnology Information) empleando el programa de búsqueda Mascot (Matrix Science) [115]. Tanto los espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, como los resultados de la búsqueda en bases de datos son revisados manualmente en detalle utilizando los programas arriba mencionados y otras aplicaciones diseñadas en la propia Unidad.

9.2.2. Identificación de proteínas (4700 Proteomics Analyzer).

Se aplica una alícuota (1 μ l) de una mezcla de la digestión triptica (0.5 μ l) con una alícuota (0.5 μ l) de la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 3 mg/ mL en 50% v/v acetonitrilo, 0.1% v/v ácido trifluoroacético) en la placa portamuestras “Stained Steel Plate” (Applied Biosystems) y se deja cristalizar a temperatura ambiente. Los datos MALDI-MS(/MS) se obtienen en un espectrómetro de masas (EM) 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems), equipado con dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem (TOF-TOF) y una cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones. Los espectros de masas se miden en modo reflector positivo, aplicando los siguientes parámetros: voltaje de aceleración de 20 kV, voltaje de rejilla 76%, tiempo de retardo 160 ns y se acumulan 10 disparos en cada espectro. De los espectros MS se seleccionan los precursores más apropiados para el análisis MS/MS con la CID conectada (empleando gas atmosférico) a un voltaje de 1 kV en modo ion reflector y con una ventana de masa para el precursor de ± 10 Da. Se realizan una calibración externa del EM, utilizando el kit Sequazime Peptide Mass Standard (Perspective Biosystems); y una calibración interna, utilizando los péptidos resultantes de la digestión autolítica de la tripsina usada en la digestión ($m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$), lo que permite obtener un error en las masas peptídicas inferior a 50 ppm. Los espectros obtenidos son filtrados

y corregidos con el programa Data Explorer (Applied Biosystems) y se eliminan los picos contaminantes de tripsina, queratinas, etc. para obtener la lista de picos peptídicos definitiva (se utilizaron las masas monoisotópicas). El posterior análisis para la identificación se realizó con el programa GPS Explorer (Applied Biosystem), empleando la misma base de datos de proteínas que en el caso anterior (National Center for Biotechnology Information) o SwissProt, y empleando también Mascot (Matrix Science), a través del software “Global Protein Server v3.5” (Applied Biosystems)

10. Validación de los resultados: Inmunodetección

10.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE unidimensional).

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizan según Laemmli [149], en minigeles SDS-PAGE de 9 x 7 cm, usando el sistema de electroforesis “mini-PROTEAN3” y/o “mini-PROTEAN-Tetra” (Bio-Rad), utilizando una disolución concentrada de acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida al 0.8% (p/v). Los geles se preparan en dos fases: la fase “separadora” de acrilamida-bisacrilamida, de concentración variable en función de la masa molecular esperado de la proteína a analizar (entre el 7 y el 15% de acrilamida), añadiendo a la solución concentrada de partida Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, SDS 10% (p/v) y agua bidestilada para obtener la concentración de acrilamida deseada en cada caso. Para la fase “concentradora”, se diluye la solución concentrada de acrilamida con Tris-HCl 1.5 M pH 6,8, SDS 10% (p/v) y agua bidestilada para obtener una concentración final del 4%. En cada fase se añaden APS y TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización.

Todas las muestras se cuantifican según el método de Bradford [202]. Las muestras se diluyen en tampón de carga (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, SDS 3.5 % (p/v), Glicerol 16.5% (v/v), β -mercaptoetanol 8% (v/v) y trazas de azul de bromofenol) y se calientan a 95°C durante 5min antes de aplicarlas en los pocillos del gel. Las electroforesis se llevan acabo aplicando un voltaje inicial de 80V durante 5-10min., seguido de 120V durante 1.5-2h.

10.2. Electroforesis bidimensional.

Las electroforesis bidimensionales se efectúan según se describe en el apartado 4, con algunas modificaciones. Tras el isoelectroenfoque y el equilibrado, se recortan las tiras IPG de 18cm hasta un tamaño de 7cm, para poder colocarlas a continuación sobre minigeles SDS-PAGE de 9 x 7 cm. La región de 7cm seleccionada de cada tira, así

como la concentración final de acrilamida del minigel, dependen del punto isoeléctrico y de la masa molecular de la proteína a analizar. En ocasiones, se emplearon directamente tiras IPG de 7cm de intervalo de pH 4-7. Las electroforesis se llevan a cabo empleando el sistema “mini-PROTEAN3” y/o “mini-PROTEAN-Tetra” (Bio-Rad), en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

Para visualizar las proteínas en aquellos geles que no se transfieren a membrana se utiliza la tinción con azul de Coomassie convencional descrita anteriormente.

10.3. Transferencia a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección indirecta.

La inmovilización de proteínas sobre filtros de nitrocelulosa (Bio-Rad) se realiza mediante transferencia semiseca (Bio-Rad) durante 25 min. a 20 V, utilizando el siguiente tampón de transferencia: Tris base 25mM, Glicocola 151.8 mM y metanol al 20% (v/v). A continuación, los filtros de nitrocelulosa se tiñen sumergiéndolos en una solución de Rojo Ponceau S (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 30% (p/v) y ácido sulfosalicílico al 30% (p/v) durante 1 min., tras lo cual se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se toma una imagen digitalizada de cada filtro con el densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad).

Una vez inmovilizadas las proteínas en los filtros de nitrocelulosa, estos se bloquean en una solución de leche en polvo desnatada 7.5% (p/v) en PBS (Na_2HPO_4 80mM, NaH_2PO_4 20mM, NaCl 100mM, pH 7.5) durante toda la noche a 4°C y en agitación. Tras el bloqueo, todos los pasos posteriores se realizan a temperatura ambiente y en agitación. Los filtros se lavan 3 veces durante 10 min. en un tampón de lavado compuesto PBS y Tween20 0.1% (v/v). A continuación los filtros se incuban durante 1 hora con el anticuerpo específico para la proteína que queremos detectar, diluido en el tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada, a una concentración adecuada (determinada empíricamente) para cada ensayo. Tras realizar otros 3 lavados de 10 min. en el tampón de lavado, los filtros se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa, diluido nuevamente en el tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada, a la concentración adecuada. Finalmente, se repiten los 3 lavados de 10 min. y se procede al revelado utilizando el sustrato adecuado (ECL). Las imágenes obtenidas se digitalizan nuevamente (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad). En la tabla TM-02 se detallan los anticuerpos y las diluciones empleados para cada ensayo.

PROTEÍNA	Anticuerpo		Condiciones Inmunodetección	
		Marca	1ario	2ario
Transtiretina	IgY Chicken	GenWay	1:5000	α -Chicken (GenWay) 1:1000
Apolipoproteína J	IgG Mouse Mc	Abcam	1:500	TrueBlot α -Mouse (eBiosciences) 1:1000
TPM4	Rabbit Pc	Chemicon International Inc.	1:500	TrueBlot α -Mouse (eBiosciences) 1:1000
β -Actina	IgG Mouse Mc	Sigma	1:4000	TrueBlot α -Mouse (eBiosciences) 1:1000
SAA	IgG Mouse Mc	Biodesign	1:4000	TrueBlot α -Mouse (eBiosciences) 1:1000
S100 A8	IgG Mouse Mc	Chemicon International Inc.	1:1000	α -Mouse (Nordic Immunology) 1:2500
Vimentina	IgG Mouse Mc	Chemicon International Inc.	1:1000	α -Mouse (Nordic Immunology) 1:2500
PON I	IgG Mouse Mc	Dr. Ricard W. James	1:1000	α -Mouse (Nordic Immunology) 1:2500
Catepsina D	Goat Pc	Abcam	1:200	α -Goat (Nordic Immunology) 1:2500
Oncogén DJ1	Goat Pc	Abcam	1:1000	α -Goat (Nordic Immunology) 1:2500
HSP70	Goat Pc	Santa Cruz Biotech.	1:1000	α -Goat (Nordic Immunology) 1:2500

Tabla TM_02: Relación de los anticuerpos utilizados en los diferentes experimentos de inmunodetección, con el tipo de anticuerpo, marca y dilución empleada en cada caso

Resultados

Quien no se quede a cuadros con este asunto es
que no lo ha entendido.

Niels Bohr, sobre la mecánica cuántica.

A) MONOCITOS

1. Análisis comparativo de los geles bidimensionales

La metodología de aislamiento y análisis mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) de los monocitos circulantes había sido puesta a punto en nuestro laboratorio previamente [21]. El objetivo de dicha metodología era su aplicación al estudio de pacientes con SCA, para realizar un análisis comparativo de los patrones de expresión de proteínas de los monocitos circulantes en una colección de muestras de pacientes con SCA, que habían sido recogidas a diferentes tiempos (tabla TR_01): en el momento del ingreso en urgencias (pacientes T=0), a los 4 días (pacientes T=4d), 2 meses (pacientes T=2m) y 6 meses después del episodio agudo (pacientes T=6m). Estos pacientes se dividieron en dos grupos: en uno de ellos los pacientes fueron tratados con Atorvastatina 80mg/d durante los dos primeros meses [pacientes T=2m(+ATV)], mientras que en el otro recibieron un tratamiento convencional (pacientes T=2m). Tras los 2 primeros meses, todos los pacientes pasaron a recibir un mismo tratamiento (pacientes T=6m). Todas estas muestras debían ser comparadas con dos grupos control, uno compuesto por voluntarios sanos (sanos) y otro por pacientes estables (estables), que habían sufrido un síndrome coronario agudo con anterioridad (al menos un año antes de su incorporación al estudio, sin ningún otro evento coronario en ese tiempo) y que llevaban vida normal con un tratamiento estándar. Como se indicó en el apartado 1 de Materiales y métodos, para constituir estos dos grupos se seleccionaron individuos con una distribución de sexo y edad sin diferencias significativas respecto al grupo de pacientes con SCA.

Resultados

Nombre del grupo	Definición
Pacientes T=0	Pacientes con SCA, en el momento del ingreso en urgencias
Pacientes T=4d	Pacientes con SCA, 4 días después del episodio agudo
Pacientes T=2m	Pacientes con SCA, 2 meses después del episodio agudo, tratados con terapia convencional
Pacientes T=2m(+ATV)	Pacientes con SCA, 2 meses después del episodio agudo, tratados Atorvastatina 80 mg/d
Pacientes T=6m	Pacientes con SCA, 6 meses después del episodio agudo
Estables	Pacientes que habían sufrido un SCA al menos un año antes de su incorporación al estudio, sin ningún otro evento coronario en ese tiempo y que habían llevado vida normal con un tratamiento estándar
Sanos	Voluntarios sanos

Tabla TR_01: Listado de los nombres que asignamos a los grupos objeto de estudio, junto a una breve descripción de cada uno de ellos.

1.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional)

Se comenzó por el estudio de los mapas proteicos de los monocitos circulantes de los pacientes el momento del ingreso en urgencias, a los 4 días, 2 meses y 6 meses después del episodio agudo del grupo de individuos que habían recibido el tratamiento convencional (pacientes T=0, pacientes T=4d, pacientes T=2m, pacientes T=6m), comparándolos en primer lugar con el grupo control sanos y después con el grupo control estables. Para realizar este análisis, se diseñó un experimento en el que se incluyeron entre 4 y 6 geles por grupo de estudio. Las imágenes digitalizadas de los geles teñidos con plata se procesaron mediante el programa PDQuest 2-D Analysis Software y, tras la detección automática de puntos, el emparejamiento de los mismos en todos los geles y una revisión manual pormenorizada, se incluyeron 1015 manchas proteicas en el estudio. El mismo programa realizó el densitometrado de las manchas, la normalización de los datos y el análisis de la expresión diferencial de las manchas entre los diferentes grupos. Finalmente, estos datos fueron importados al programa estadístico SPSS con el que se realizó la prueba de ANOVA.

1.1.1. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de voluntarios sanos.

Los resultados de la prueba de ANOVA revelaron la existencia de 23 manchas proteicas cuya expresión se veía significativamente alterada ($p < 0.05$) en los pacientes T=0 (4 manchas aumentadas en los pacientes, 5 disminuidas y 14 de ellas ausentes respecto a sanos). En los pacientes T=4d aparecieron 10 manchas proteicas con variaciones estadísticamente significativas (1 aumentada en los pacientes, 2 disminuidas

y 7 de ellas ausentes respecto a sanos). En los pacientes T=2m el número de alteraciones significativas se redujo a 8 (1 de ellas aumentada en los pacientes, 2 disminuidas y 5 ausentes respecto a sanos). Por último, en los pacientes T=6m sólo 5 manchas proteicas mostraron diferencias estadísticamente significativas en su expresión (1 de ellas disminuida y las 4 restantes ausentes en los pacientes) respecto a los sanos. Estas 5 diferencias coincidían con las que mostraba el grupo de estables respecto a los sanos (figura R_01A). En total, el número de manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión detectadas en esta comparación ascendió a 25.

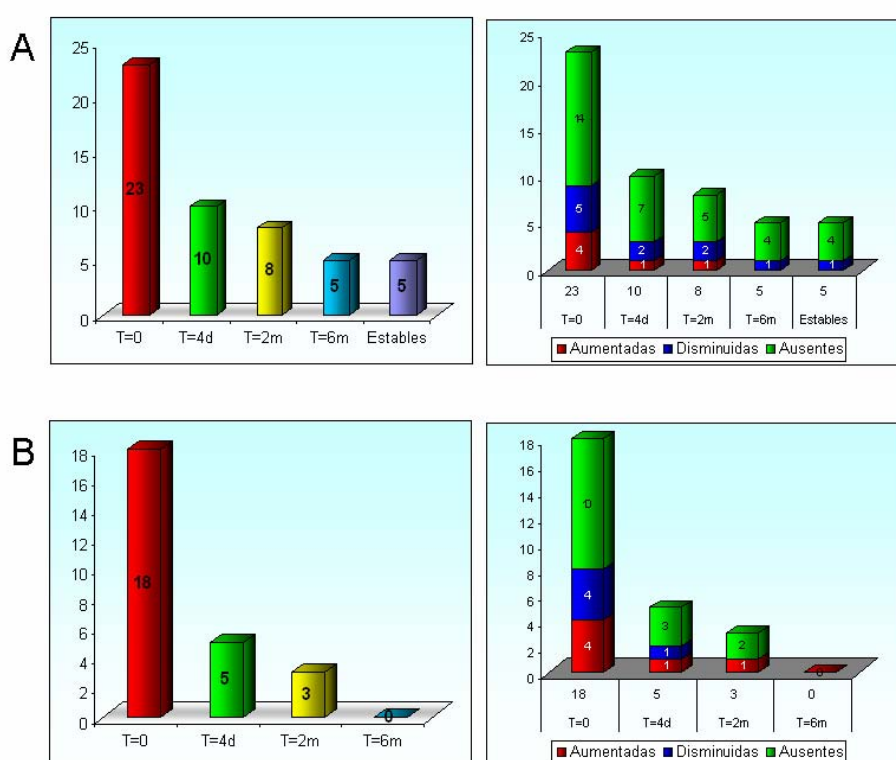


Figura R_01: Resultados de la comparación entre el grupo control sanos, los pacientes con SCA (a excepción de los tratados con Atorvastatina) y los pacientes estables. Gráficas representativas del número de manchas proteicas con variaciones significativas en sus niveles de expresión. (A) Comparación respecto al grupo de control sanos. A la izquierda se representa el número global de variaciones para cada grupo de estudio en comparación con los sanos. A la derecha se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo, disminuciones en azul y ausencias en verde) detectadas en cada grupo. (B) Comparación respecto al grupo control de pacientes estables. A la izquierda se representa el número global de variaciones para cada grupo de estudio en comparación con los estables. A la derecha se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo, disminuciones en azul y ausencias en verde) detectadas en cada grupo.

1.1.2. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de pacientes estables.

En este caso, la prueba de ANOVA mostró que los pacientes T=0 presentaban alteraciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de 18

Resultados

manchas proteicas (4 aumentadas, 4 disminuidas y 10 ausentes) respecto a los pacientes estables. Este número se reducía a 5 manchas en los pacientes T=4d (1 aumentada, 1 disminuida y 3 ausentes respecto a los estables) y a sólo 3 manchas en los pacientes T=2m (1 aumentada y 2 ausentes), mientras que los pacientes T=6m no presentaron ninguna mancha diferencialmente expresada respecto a los pacientes estables (figura R_01B). Hay que recordar que los estables mostraron 5 diferencias estadísticamente significativas con los sanos (figura R_01A). En conjunto, 20 manchas proteicas presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas en esta comparación.

1.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina).

Por otra parte, nos interesaba saber si el grupo que había sido tratado con Atorvastatina presentaba alguna diferencia respecto al grupo que había recibido el tratamiento convencional. Para ello, debíamos comparar los mapas proteicos de las muestras obtenidas después de 2 meses de tratamiento convencional (pacientes T=2m) con las de aquellos pacientes que habían recibido el tratamiento con Atorvastatina [pacientes T=2m(+ATV)] y con el grupo control (sanos). Debemos recordar que durante los 4 primeros días tras el ingreso en urgencias todos los pacientes habían recibido la misma medicación y que 2 meses más tarde los tratamientos volvieron a unificarse, por lo que solo era necesario incluir en este estudio las muestras obtenidas 2 meses después del evento coronario agudo.

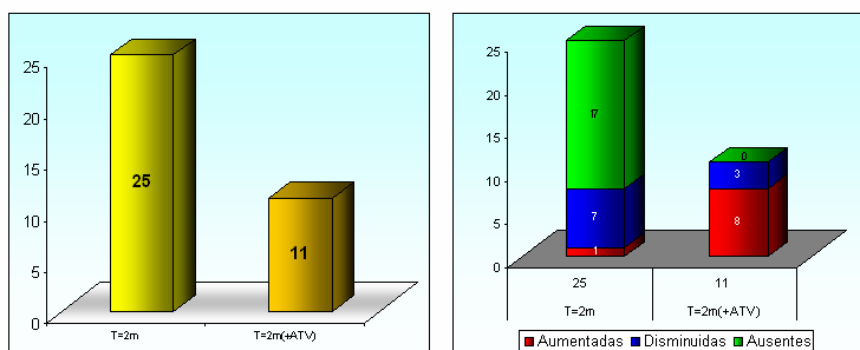


Figura R_02: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) entre el grupo control sanos y los pacientes T=2m y T=2m(+ATV). Gráficas representativas del número de manchas proteicas con variaciones significativas en sus niveles de expresión respecto al grupo de control sanos. A la izquierda se representa el número global de variaciones para cada grupo de estudio en comparación con los sanos. A la derecha se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo, disminuciones en azul y ausencias en verde) detectadas en cada grupo.

En esta ocasión se incluyeron también entre 4 y 6 geles por grupo de estudio, cuyas imágenes fueron analizadas de nuevo mediante el programa PDQuest, con el que detectamos, emparejamos y densitometramos las 1015 manchas proteicas que incluimos en el análisis. Al igual que en el caso anterior, tras la normalización y el análisis de la expresión diferencial, los datos se exportaron al programa SPSS con el que se realizó la prueba de ANOVA. En este estudio, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de 25 manchas proteicas en los pacientes T=2m (17 ausentes, 7 disminuidas y 1 aumentada) respecto a los sanos (figura R_02). La expresión de 16 de estas manchas se normalizó completamente en los pacientes tratados con Atorvastatina [pacientes T=2m(+ATV)]. Además, la expresión de 3 manchas fue parcialmente normalizada por el tratamiento ya que, aunque las diferencias son menores, aún son significativas en los pacientes T=2m(+ATV) respecto a los sanos. Los niveles de expresión de las 6 manchas proteicas restantes estaban significativamente aumentados en los pacientes T=2m(+ATV) respecto a los pacientes T=2m y también a los sanos. Por último, el análisis mostró 2 manchas proteicas diferencialmente expresadas en los pacientes T=2m(+ATV) respecto a los sanos (aumentando una y disminuyendo la otra), que no estaban alteradas en los pacientes T=2m. Este análisis detectó en total 27 manchas proteicas diferencialmente expresadas.

2. Identificación de proteínas

Todas las manchas proteicas cuyos niveles de expresión resultaron estar significativamente alterados en alguna de las comparaciones descritas, fueron escindidas de los geles, digeridas con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y/o MALDI-TOF-TOF. Para realizar las identificaciones, los espectros adquiridos se introdujeron en el programa “MASCOT”. Las identificaciones se aceptaron cuando la mayor puntuación del coeficiente “Mowse” [114] era superior a 64 y si la cobertura de secuencia era, al menos, entre el 15% y el 30%, dependiendo del tamaño de la proteína [210], o bien cuando al menos un espectro de fragmentación permitió la secuenciación de uno de los péptidos de la proteína.

2.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional)

El análisis de los mapas proteicos de monocitos circulantes de los pacientes con SCA (excluyendo el grupo tratado con Atorvastatina), mostró alteraciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión de 25 manchas proteicas (figura R_03), que pudieron ser identificadas con éxito mediante espectrometría de masas.

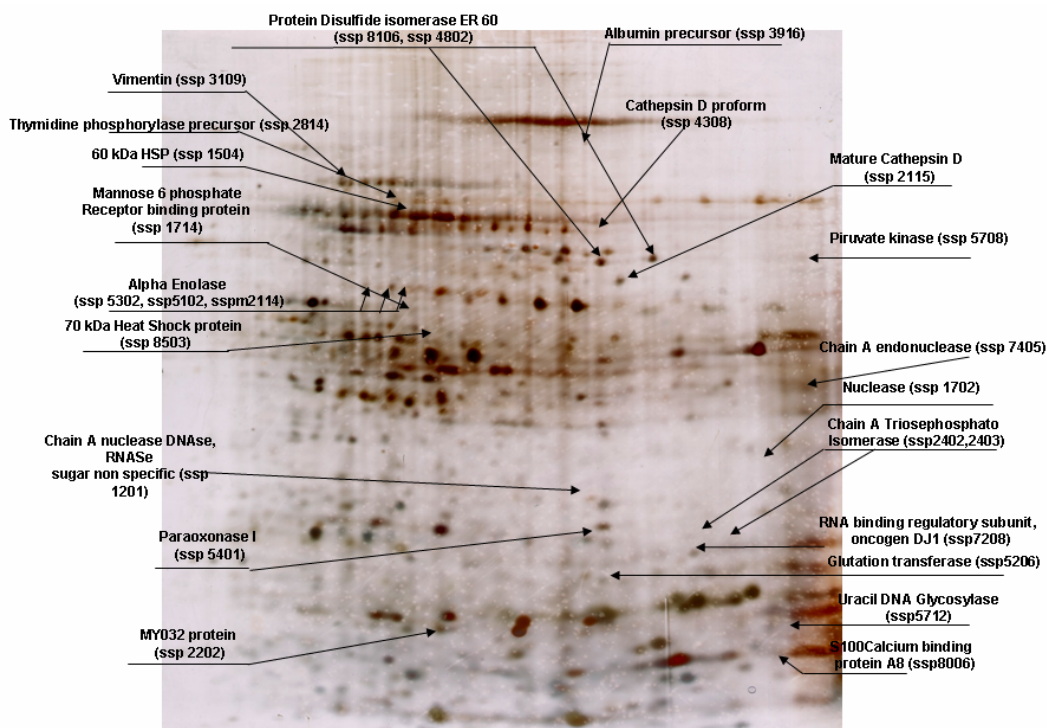


Figura R_03: Imagen representativa de un gel 2-DE (pH 4-7, 12.5% acrilamida) sobre el que aparecen señaladas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los pacientes con SCA (excluyendo los tratados con Atorvastatina) y el nombre de la proteína identificada en cada caso.

2.1.1. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de voluntarios sanos.

Las 25 manchas proteicas cuyos niveles de expresión sufrían alguna variación estadísticamente significativa, que aparecen resumidas en la tabla TR_02, corresponden a 20 proteínas diferentes.

Nº mancha	S vs T=0	S vs T=4d	S vs T=2m	S vs T=6m	S vs E	Proteína	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
1201	A	A				Chain A nuclease DNase, RNase sugar non specific	26.5	6.2	78	Q99575
1504	A	A	A	A	A	60kDa Heat Shock protein (HSP60)	60	5.48	12	P10809
1702	-2.77					Nuclease	35.4	8.42	45	P61221
1714	A					Mannose 6 phosphate receptor binding protein	47	5.3	23.5	Q60664
2114	3.5					Alpha enolase	47	7.7	34.6	P06733
2115		2.13				Mature CathepsinD	32	5.2	32.8	GI494296
2202		-10				ATP syntase (MY032 protein)	18.4	5.22	44.5	Q75947
2402	A					Chain A triosephosphate isomerase	26.5	7.7	37.9	Q6FHP9
2403	-5	-5.26	-7.69	-20.48	20.48	Chain A triosephosphate isomerase	26.5	7.7	38.3	Q6FHP9
2814	A					Thymidine phosphorylase precursor	50	5.2	13.2	P19971
3109	4.7					Vimentin	53.6	5.06	49.8	P08670
3916	A					Albumin precursor	69.4	5.8	99	P02768
4308	A	A	A			Cathepsin D proform	55	6.7	52.3	P07339
4802	A	A	A			Protein disulfide isomerase ER60	56.8	5.9	42.2	P07237
5102	10.5		2.3			Alpha enolase	47	7.7	34.6	P06733
5206	A					Glutathione transferase	25	5.3	41.3	P08263
5302	8.2					Alpha enolase	47	7.7	30.4	P06733
5401	A	A	A	A	A	Paraoxonase I (PON I)	27.5	5.7	33.7	P27169
5708	A					Pyruvate Kinase M2 isozyme	57.8	7.95	21.7	P14618
5712	-4.95					Uracil DNA glycosylase	29.2	9.1	28.1	P16769
7208	A	A	A	A	A	RNA binding regulatory subunit Oncogene DJ1	19.9	6.4	42.9	Q99497
7405	-20					Chain A endonuclease	35.4	8.4	48.2	P13717
8006	A					S100 Calcium binding protein A8 Calgranulin	10.8	6.5	53.8	P05109
8106	-2.86					Protein disulfide isomerase ER60	56.8	5.9	29.9	P07237
8503	A	A	-3.57	A	A	70 kDa Heatshock protein (HSP70)	44	5.48	16	P08107

Tabla TR_02: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación de los monocitos circulantes de los pacientes con SCA y el grupo control sanos, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el blanco indica que no existen diferencias, el verde representa una ausencia en los pacientes, el rojo representa aumento y el azul disminución respecto los sanos. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. A, Ausente; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoeléctrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; S vs T=0, comparación de los pacientes T=0 frente a los sanos; S vs T=4d, comparación de los pacientes T=4d frente a los sanos; S vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los sanos; S vs T=6m, comparación de los pacientes T=6m frente a los sanos; S vs E, comparación de los pacientes estables frente a los sanos.

2.1.2. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de pacientes estables.

La comparación con los estables mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de 20 manchas proteicas, que aparecen ilustradas en la tabla TR_03. Estas 20 manchas corresponden a 17 proteínas diferentes.

Resultados

Nº mancha	E vs T=0	E vs T=4d	E vs T=2m	E vs T=6m	Proteína	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
1201	A	A			Chain A nuclease DNase, RNase sugar non specific	26.5	7.7	38.3	Q6FHP9
1702	-2.7				Nuclease	35.4	8.42	45	P61221
1714	A				Mannose 6 phosphate receptor binding protein	47	5.3	23.5	Q60664
2114	3.5				Alpha enolase	47	7.7	34.6	P06733
2115		2.13			MatureCathepsinD	32	5.2	32.8	Gi/494296
2202		-10			ATP synthase (MY032 protein)	18.4	5.22	44.5	Q75947
2402	A				Chain A triosephosphate isomerase	26.5	7.7	37.9	Q6FHP9
2814	A				Thymidine phosphorylase precursor	50	5.2	13.2	P19971
3109	4.7				Vimentin	53.6	5.06	49.8	P08670
3916	A				Albumin precursor	69.4	5.8	99	P02768
4308	A	A	A		Cathepsin D proform	55	6.7	52.3	P07339
4802	A	A	A		Protein disulfide isomerase ER60	56.8	5.9	42.2	P07237
5102	10.5		2.3		Alpha enolase	47	7.7	34.6	P06733
5206	A				Glutathione transferase	25	5.3	41.3	P08263
5302	8.2				Alpha enolase	47	7.7	30.4	P06733
5708	A				Pyruvate Kinase M2 isozyme	57.8	7.95	21.7	P14618
5712	-4.95				Uracil DNA glycosylase	29.2	9.1	28.1	P16769
7405	-20				Chain A endonuclease	35.4	8.4	48.2	P13717
8006	A				S100 Calcium binding protein A8 Calgranulin	10.8	6.5	53.8	P05109
8106	-2.86				Protein disulfide isomerase ER60	56.8	5.9	29.9	P07237

Tabla TR_03: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación de los monocitos circulantes de los pacientes con SCA y el grupo de pacientes estables, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el blanco indica que no existen diferencias, el verde representa una ausencia en los pacientes, el rojo representa aumento y el azul disminución respecto los estables. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. A, Ausente; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoeléctrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; E vs T=0, comparación de los pacientes T=0 frente a los estables; E vs T=4d, comparación de los pacientes T=4d frente a los estables; E vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los estables; E vs T=6m, comparación de los pacientes T=6m frente a los estables.

2.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina)

El estudio de los mapas proteicos de los pacientes tratados y no tratados con Atorvastatina reveló la existencia de 27 manchas proteicas cuyos niveles de expresión mostraban diferencias estadísticamente significativas con el grupo control de individuos sanos (figura R_04). Las 27 manchas, que están recogidas en la tabla TR_04, corresponden a 20 proteínas diferentes.

Nº mancha	SvsT=2m	SvsT=2m(+ATV)	Proteína	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
1201	↓	N	Chain A nuclease DNase, RNase sugar non specific	26.5	6.2	78	Q99575
1504	A	N	60kDa Heat Shock protein (HSP60)	60	5.48	12	P10809
1702	↓	N	Nuclease	35.4	8.42	45	P61221
1804	A	PN	Ficolin	34.8	6.6	32.6	Gi/1510127
1806		↓	Ficolin	34.8	6.6	NOVO	Gi/1510127
2202	↓	N	ATP synthase (MY032 protein)				
2308	A	↑	Pyruvate Kinase 3 isoform 1	57	7.7	62.3	Gi/31416989
2402	↓	N	Chain A triosephosphate isomerase	26.5	7.7	37.9	Q6FHP9
2403	↓	N	Chain A triosephosphate isomerase	26.5	7.7	38.3	Q6FHP9
2408	A	N	Annexin I (lipocortin 1)				
2901	A	N	Prohibitin				
3121	A	N	Annexin II				
3408	A	↑	Pyruvate Kinase 3 isoform 1	57	7.7	13.7	Gi/31416989
3503	A	↑	Annexin I (lipocortin 1)	67.7	9.7	47.1	Gi/4502101
3811	A	N	Annexin II				
3903	A	N	Heat Shock-cognate 71 kD protein (HSC70)				
4301	A	N	S100 Calcium binding protein A9 (MRP14)			39.9	
4308	A	PN	Cathepsin D proform	55	6.7	52.3	Gi/494296
4506	A	N	Chain A ribonuclease inhibitor-angiogenin complex	67.3	8.6	78.0	
4708		↑	Stathmin	17.1	5.7	53	
4802	A	N	Protein disulfide isomerase ER60 (PDI)	56.8	5.9	29.9	P07237
5401	A	↑	Paraoxonase I (PON I)	27.5	5.7	33.7	P27169
6405	A	↑	Ficolin	34.8	6.6	24.8	Gi/1510127
7304	A	↑	S100 Calcium binding protein A9 (MRP14)	13.2	5.71	39.9	Gi/4506773
7405	↓	N	Chain A endonuclease	35.4	8.4	48.2	P13717
7604	↑	PN	Phosphoglycerate kinase 1	44.5	9.2	23	Gi/129921
8503	↓	N	70 kDa Heat shock protein (HSP70)	44	5.48	16	P08107

Tabla TR_04: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación de los monocitos circulantes de los pacientes T=2m y pacientes T=2m(+ATV) y el grupo control sanos, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el blanco indica que no existen diferencias, el verde representa una ausencia en los pacientes, el rojo representa aumento y el azul disminución respecto los sanos. N, Normalizado por el tratamiento; PN, Parcialmente normalizado por el tratamiento; A, Ausente; ↑, aumento; ↓, disminución; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoeléctrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; S vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los sanos; S vs T=2m(+ATV), comparación de los pacientes T=2m(+ATV) frente a los sanos.

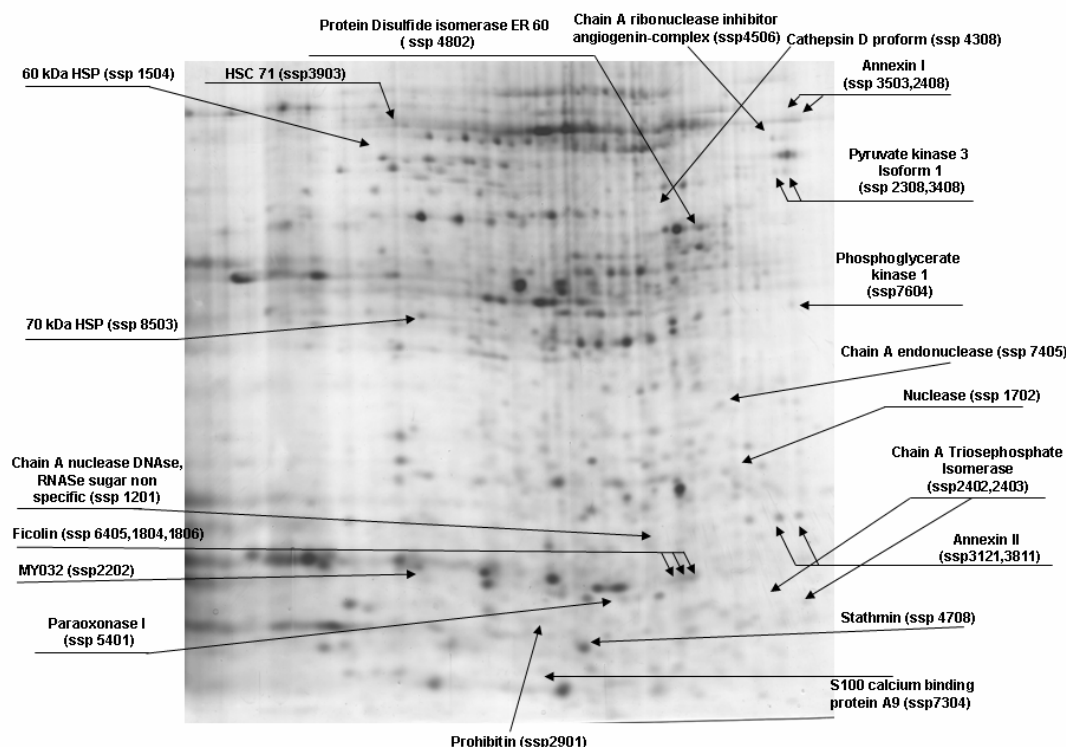


Figura R_04: Imagen representativa de un gel 2-DE (pH 4-7, 12.5% acrilamida) sobre el que aparecen señaladas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los pacientes T=2m y T=2m(+ATV) con los sanos. Se indica también el nombre de la proteína identificada en cada caso.

2.3. Clasificación funcional de las proteínas identificadas

En total se identificaron 41 manchas proteicas, las cuales corresponden a 31 proteínas diferentes, que pudimos agrupar en 6 categorías funcionales (figura R_05):

- Proteínas energéticas y del metabolismo: α -Enolasa, ATP-sintasa (proteína MY032), Endonucleasa, Nucleasa-ADNasa-ARNasa no específica de azúcar, Triosafosfato-isomerasa, Glutation-transferasa, Proteína de unión el receptor Manosa-6-fosfato, Nucleasa, Fosfoglicerato-quinasa 1, Proteína Disulfuro-isomerasa ER60 (PDI), Piruvato-quinasa 3 isoforma 1, Piruvato-quinasa M2 isozima.
- Enzimas hidrolíticas: Catepsina D proforma, Catepsina D madura, Uracilo-ADN-glicosilasa.
- Proteínas de estrés: Proteína de choque térmico de 60kDa (HSP60), Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), Proteína-conato de choque térmico de 71 kDa (HSC70), Paraoxonasa I (PON I), Oncogén DJ1.
- Proteínas implicadas en procesos de inflamación y trombosis: Anexina I (Lipocortina 1), Anexina II, Ficolina.

- e) Contráctiles y estructurales: Vimentina, Estatmina.
- f) Otras funciones: Precursor de la Albúmina, complejo Inhibidor de Ribonucleasa-Angiogenina, Prohibitina, Proteína de unión a Calcio S100 A8 Calgranulina, Proteína de unión a Calcio S100 A9 (MRP14), Precursor de la Timidina-fosforilasa.

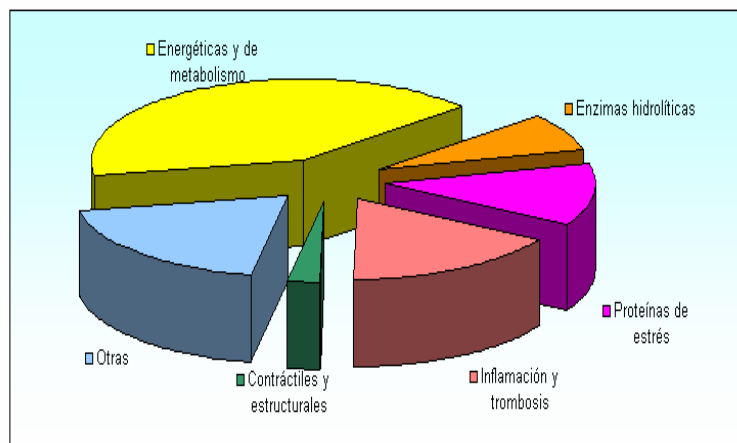


Figura R_05: Clasificación de proteínas por su funcionalidad. El gráfico muestra la distribución de las 41 manchas proteicas identificadas en el conjunto de los análisis realizados (que corresponden a 31 proteínas) en 6 grupos funcionales: Energéticas y del metabolismo, Enzimas hidrolíticas, Proteínas de estrés, Inflamación y trombosis, Contráctiles y estructurales y Otras funciones (que incluye aquellas proteínas cuya función no pertenecía a ninguno de los grupos anteriores).

Las tablas TR_05-10 detallan las funciones de cada una de las proteínas identificadas.

Proteína	Función
Alpha enolase	Glicolisis. Estrés oxidativo
ATP synthase (MY032 protein)	Síntesis de ATP. Complejo ATPasa mitocondrial
Chain A endonuclease	Hidrólisis del ADN
Chain A nuclease DNase, RNase sugar non specific	Hidrólisis del ADN
Chain A triosephosphate isomerase	Glicolisis
Glutathione transferase	Conjugación del glutatión. Detoxificación
Mannose 6 phosphate receptor binding protein	Transporte de proteínas desde los endosomas al trans-Golgi
Nuclease	Hidrólisis del ADN
Phosphoglycerate kinase 1	Glicolisis
Protein disulfide isomerase ER60	Reajuste de los puentes disulfuro
Pyruvate Kinase 3 isoform 1	Glicolisis

Tabla TR_05: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Energéticas y de metabolismo”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Cathepsin D proform	Enzima proteolítica. Ruptura de proteínas intracelulares
Mature CathepsinD	Enzima proteolítica. Ruptura de proteínas intracelulares
Uracil DNA glycosylase	Proteasa. Previene la mutagénesis

Tabla TR_06: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Enzimas hidrolíticas”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Resultados

Proteína	Función
60kDa Heat Shock protein (HSP60)	Transporte de componentes de membrana a través de la célula
70 kDa Heat Shock protein (HSP70)	Chaperona
Heat Shock-cognate 71 kD protein (HSC70)	
Paraoxonase I (PON I)	Ruta de las pentosas fosfato. Antioxidante
RNA binding regulatory subunit Oncogene DJ1	Transforma células cuando es coexpresada con H-Ras

Tabla TR_07: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Proteínas de estrés”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Annexin (lipocortin 1)	Promoción de la fusión de membrana. Anti-inflamatoria
Annexin II	Fibrinolisis
Ficolin	Unión a antígenos, unión a iones calcio, respuesta antimicrobiana, opsonización, unión a azúcares

Tabla TR_08: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Inflamación y trombosis”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Vimentin	Filamentos de clase III
Stathmin	Transducción de señales. Regulación del citoesqueleto microtubular y del ciclo celular

Tabla TR_09: Lista de las proteínas en la categoría “Contráctiles y estructurales”. Junto a la proteína aparece una breve descripción de su función específica.

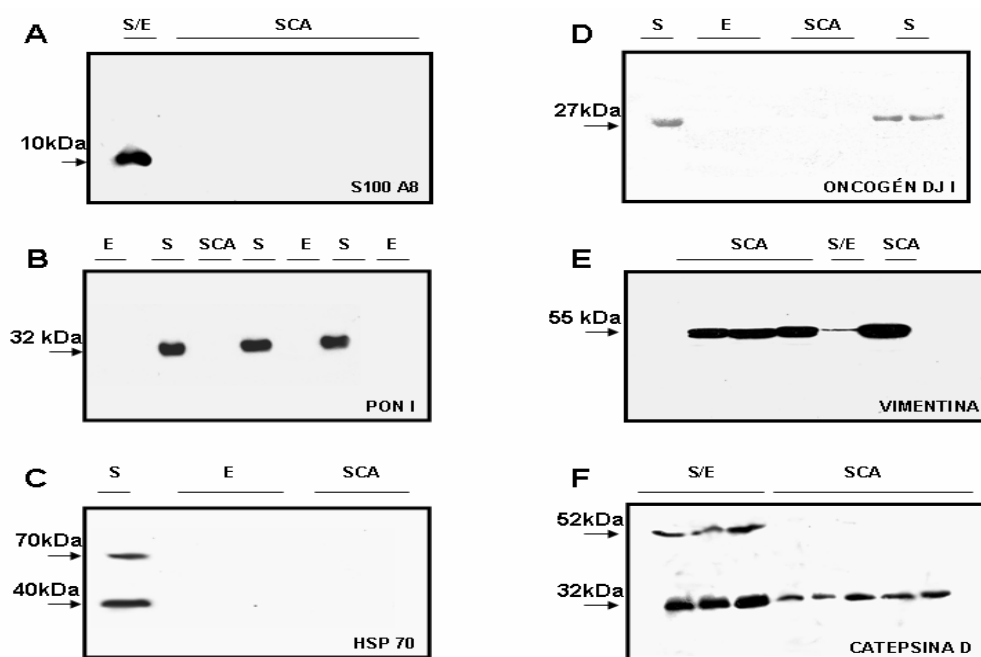
Proteína	Función
Albumin precursor	Regulación de la presión osmótica coloidal de la sangre
Chain A ribonuclease inhibitor-angiogenin complex	Inhibe proteínas libres de célula
Prohibitin	Desarrollo mitocondrial y estabilidad
S100 Calcium binding protein A8 Calgranulin	Activación de macrófagos. Regulación de mutaciones en células mieloides. Metabolismo de ácidos grasos
S100 Calcium binding protein A9 (MRP14)	Activación de macrófagos. Regulación de mutaciones en células mieloides. Metabolismo de ácidos grasos
Thymidine phosphorylase precursor	Mantenimiento de los vasos sanguíneos. Factor angiogénico

Tabla TR_10: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Otras funciones”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

3. Validación de los resultados mediante inmunodetección

Para confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis proteómico, se analizó un grupo de 6 proteínas en los extractos proteicos de monocitos de los que disponíamos mediante inmunodetección en geles de una dimensión (figura R_06). En el experimento de inmunodetección para la Proteína de unión a Calcio S100 A8 Calgranulina, se detectó una banda inmunorreactiva de 10 kDa en los individuos sanos, que no aparecía en ninguno de los pacientes T=0 (figura R_06A). La banda de 10 kDa que corresponde a la masa molecular de la Proteína de unión a Calcio S100 A8

Calgranulina apareció también en los pacientes estables, y en todos los pacientes con SCA a excepción de los pacientes T=0 (figura R_06A). En los experimentos de inmunodetección para las proteínas Oncogén DJ1, HSP70 y PON I se obtuvo el mismo resultado. La banda inmunorreactiva de 32 kDa, que corresponde a la proteína PON I (figura R_06B), la banda de 70 kDa, que corresponde a la proteína HSP70 (figura R_06C) y la de 27 kDa, que corresponde a la proteína Oncogén DJ1 (figura R_06D) aparecen en los sanos pero no en los pacientes. En cambio, en el caso de la Vimentina, la banda inmunorreactiva de 55 kDa que corresponde a esta proteína aparecía aumentada en los pacientes respecto a los sanos (figura R_06E). Finalmente, en la inmunodetección de la Catepsina D (figura R_06F) la banda inmunorreactiva de 32 kDa, correspondiente a la forma madura de la proteína, evidenció un aumento de la expresión de esta forma, pero no de su forma precursora (la banda inmunorreactiva de 52 kDa), que está ausente en los pacientes, lo que confirma los resultados obtenidos en el análisis mediante 2-DE.



Barderas et al. J. Proteome. Res. 2007, 6, 876-886

Figura R_06: Resultados de las inmunodetecciones realizadas para confirmar los resultados del análisis mediante 2-DE. (A) Proteína de unión a Calcio S100 A8 Calgranulina: Muestra una banda inmunorreactiva de 10 kDa en los sanos y los estables (S/E) que no se observa en los pacientes con SCA (SCA) (B) En el caso de la proteína PON I, aparece una banda inmunorreactiva de 32 kDa en los sanos (S) pero no en los pacientes con SCA (SCA) ni en los estables (E). (C) HSP70, el anticuerpo detecta dos bandas (44 y 70 kDa) en los sanos (S), pero ninguna de ellas aparecen en los pacientes con SCA (SCA) ni en los estables (E). (D) la proteína Oncogén DJ1 muestra un resultado similar al de PON I: aparece una única banda (en este caso de 27 kDa) en los sanos pero no en los pacientes con SCA (SCA) ni en los estables (E). (E) La inmunodetección de la Vimentina muestra un aumento de la expresión en los pacientes con SCA (SCA) respecto a los sanos y los estables (S/E). (F) En el caso de la Catepsina D se observan dos bandas inmunorreactivas en los sanos y en los estables (S/E) que corresponden a la forma precursora (52 kDa) y la madura (32 kDa) de la enzima. Sólo se detecta la forma madura en los pacientes con SCA (SCA), lo que confirma los resultados obtenidos mediante el análisis proteómico.

B) PLASMA

1. Depleción de las proteínas mayoritarias del plasma

Con el objetivo de aumentar la proporción de las proteínas menos abundantes del plasma en los geles bidimensionales, utilizamos el sistema “Multiple Affinity Removal System” (Agilent Technologies). Este sistema se basa en una columna de afinidad capaz de retener específicamente las seis proteínas mayoritarias (albúmina, IgG, IgA, haptoglobina, transferrina y antitripsina), que se acopla a un sistema cromatográfico de alta resolución (FPLC). La figura M_02 muestra esquemáticamente el proceso de separación de las proteínas mayoritarias, que quedan retenidas en el interior de la columna tras la inyección de la muestra diluida en un tampón fosfato de pH neutro (Tampón A). El resto de las proteínas salen de la columna durante los primeros minutos del proceso, componiendo el primer pico cromatográfico. Posteriormente se aplica un tampón con urea y pH ácido (Tampón B), que libera las proteínas retenidas en la columna, constituyendo el segundo pico del cromatograma. Habitualmente, tras cada ciclo cromatográfico se obtienen 50-150 μ g de proteínas no retenidas. Se comprobó la reproducibilidad del método superponiendo varios cromatogramas consecutivos y no consecutivos (Figura R_07A), que resultaron ser casi idénticos. Esta gran reproducibilidad nos permite combinar varias fracciones “no retenidas” tras varios ciclos cromatográficos, lo cual es necesario para obtener la cantidad de proteína requerida en los experimentos posteriores.

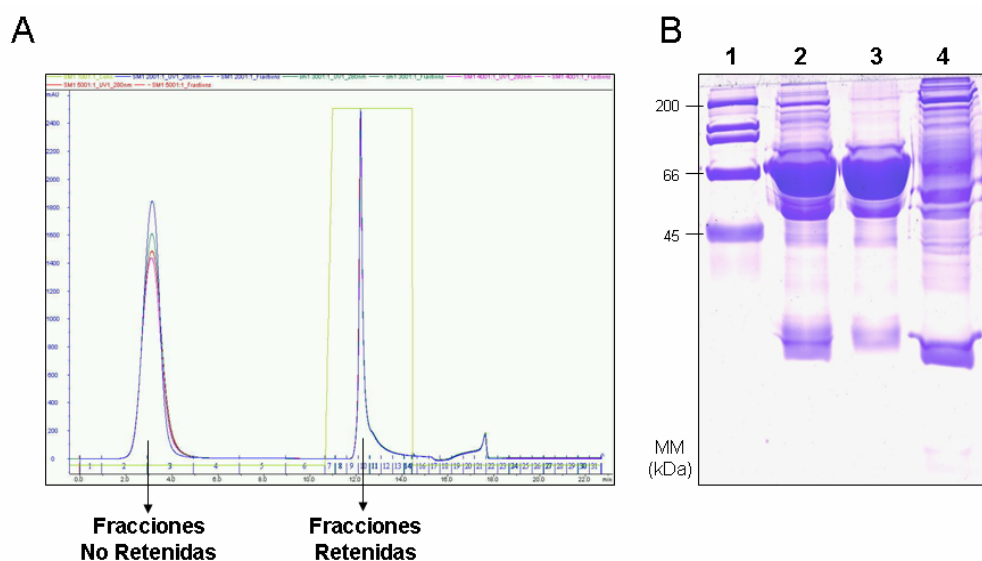


Figura R_07: (A) Superposición de los cromatogramas obtenidos en 4 ciclos cromatográficos independientes. Se observa la gran reproducibilidad de este método de depleción. (B) Gel SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie donde se comparan los patrones del suero humano completo con la fracción retenida y la no retenida por la columna. Carril 1: Marcadores de masa molecular; Carril 2: Plasma completo; Carril 3: Fracción retenida; Carril 4: Fracción no retenida (plasma deplecionado).

Para comprobar la eficacia del método de depleción, se realizaron varios geles SDS-PAGE unidimensionales, comparando los patrones proteicos del plasma humano sin deplecionar (o plasma completo) con las fracciones obtenidas tras la depleción. El patrón de bandas de la fracción retenida mostró un gran parecido con el del plasma completo, mientras que el carril correspondiente a la fracción no retenida presentaba un aspecto muy diferente, resolviendo un gran número de bandas apenas perceptibles en los dos anteriores (Figura R_07B).

2. Electroforesis bidimensional (2-DE) del plasma

Una vez comprobada la eficacia del método de depleción de las proteínas mayoritarias, pasamos a analizar las muestras mediante electroforesis bidimensional.

Antes de poder realizar el isoelectroenfoco, fue necesario encontrar un método para desalar y concentrar las muestras a un tampón compatible con esta técnica, puesto que los tampones en que se encuentran las fracciones tras la cromatografía son incompatibles por su contenido en sales. Para ello, las fracciones se equilibran en un tampón bicarbonato y se concentran centrifugando en tubos concentradores (apartado 3 de Materiales y métodos), antes de cuantificar mediante el método de Bradford. Este paso nos permite preparar alícuotas de concentración conocida (250 μ g) que vamos a poder congelar y liofilizar para finalmente resuspenderlas en el tampón de rehidratación.

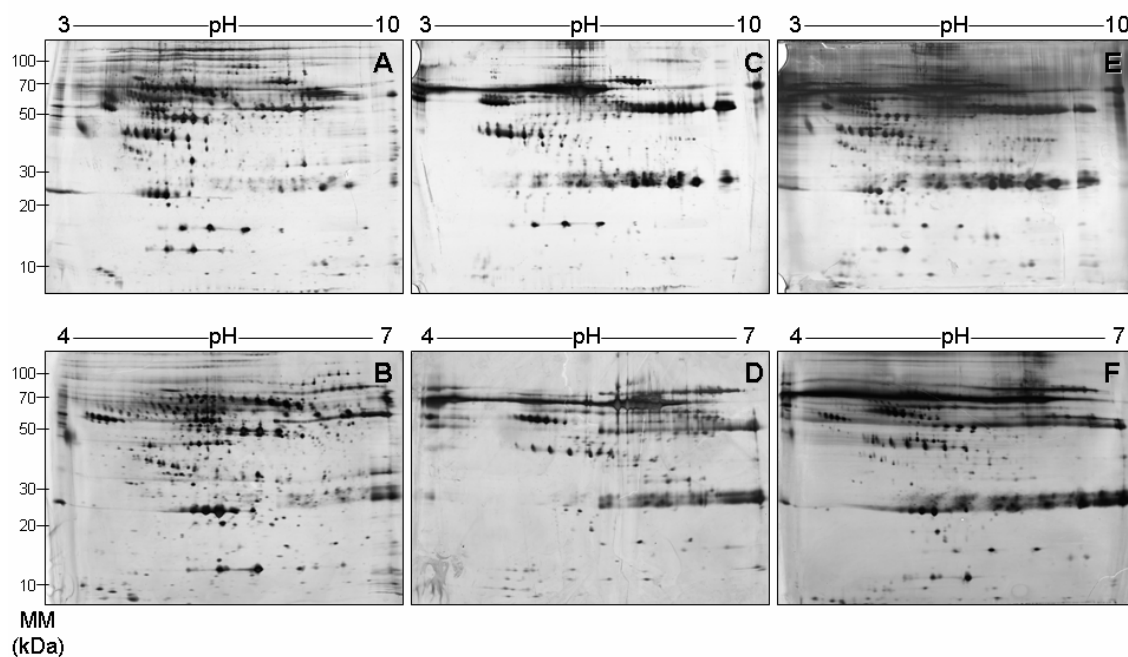


Figura R_08: Imágenes representativas de geles bidimensionales de la fracción no retenida (A,B), de la fracción retenida (C,D) y de plasma completo (E,F); Primera dimensión, IPG de 24cm, pH 3-10NL (A,C,E); pH 4-7 (B,D,F); Segunda dimensión gradiente de acrilamida 10-16%.

A continuación probamos a realizar el isoelectroenfoque empleando tiras IPG de 24 cm. con rangos de pH de 4-7 lineal y de 3-10 no lineal, empleando tanto la fracción no retenida (o plasma deplecionado) como la retenida (albúmina, IgG, IgA, haptoglobina, transferrina y antitripsina) y plasma sin deplecionar. Las segundas dimensiones, tras el equilibrado de las tiras, se realizaron empleando geles en gradiente de acrilamida 10-16%. En la figura R_08 aparece una muestra representativa de estos geles, dos de los cuales corresponden al plasma deplecionado (figura R_08 A y B), otros dos a la fracción retenida (figura R_08 C y D) y los dos últimos al plasma completo (figura R_08 E y F). Un primer análisis de las imágenes utilizando el programa “PDQuest 2-D Analysis Software” (Bio-Rad) reveló que en los geles de la fracción retenida aparecen aproximadamente 300 puntos en el rango de pH de 4-7 (figura R_08D) y unos 500 en el rango 3-10 NL (figura R_08C), mientras que en los geles correspondientes al plasma deplecionado se resuelven alrededor de 1000 puntos en el rango de pH de 4-7 (figura R_08B), y unos 1300 el rango 3-10 NL (figura R_08A). Observamos una alta reproducibilidad en todos los casos y una mejor resolución en el rango 4-7 que en el 3-10 NL, especialmente en el caso del plasma deplecionado. Además, la diferencia mostrada entre los patrones proteicos de la fracción retenida y el plasma completo respecto del plasma deplecionado en SDS-PAGE se verifica en los geles bidimensionales, siendo el plasma completo mucho más parecido en aspecto y número de puntos (unos 400 en el rango de pH de 4-7 y unos 600 en el rango 3-10 NL) a la fracción retenida.

3.Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) del plasma

Para emplear esta técnica, debíamos comprobar que los fluorocromos del sistema DIGE fueran capaces de marcar covalentemente las proteínas de nuestra muestra deplecionada. Para ello, las fracciones equilibradas en el tampón bicarbonato son liofilizadas y posteriormente resuspendidas en un tampón adecuado (apartado 7.1 de Materiales y métodos) para realizar el marcaje con los fluorocromos. Tras comprobar que el pH de las muestras se encuentra en el rango apropiado, se realiza el marcaje y, a continuación, se lleva a cabo la electroforesis bidimensional en las mismas condiciones que en el apartado anterior, evitando la exposición de las proteínas marcadas a la luz. Realizamos un experimento piloto (figura R_09) para comprobar la eficacia del marcaje en nuestras muestras. En este primer experimento (empleando IPG pH 4-7 de 18 cm. y

gel al 12% de acrilamida para la segunda dimensión) detectamos unos 600 puntos al analizar las imágenes con el módulo DIA del programa “DeCyder Differential Analysis Software” (GE Healthcare). Sin embargo, la longitud de la tira IPG utilizada no era óptima, ya que los puntos aparecían muy solapados, provocando una pobre resolución en el gel. Por ello, decidimos utilizar los geles de 24 cm. en gradiente de acrilamida 10-16% en experimentos posteriores. De este modo, utilizando tiras IPG de 24 cm. con el mismo rango de pH, se detectaron alrededor de 1000 puntos en cada gel.

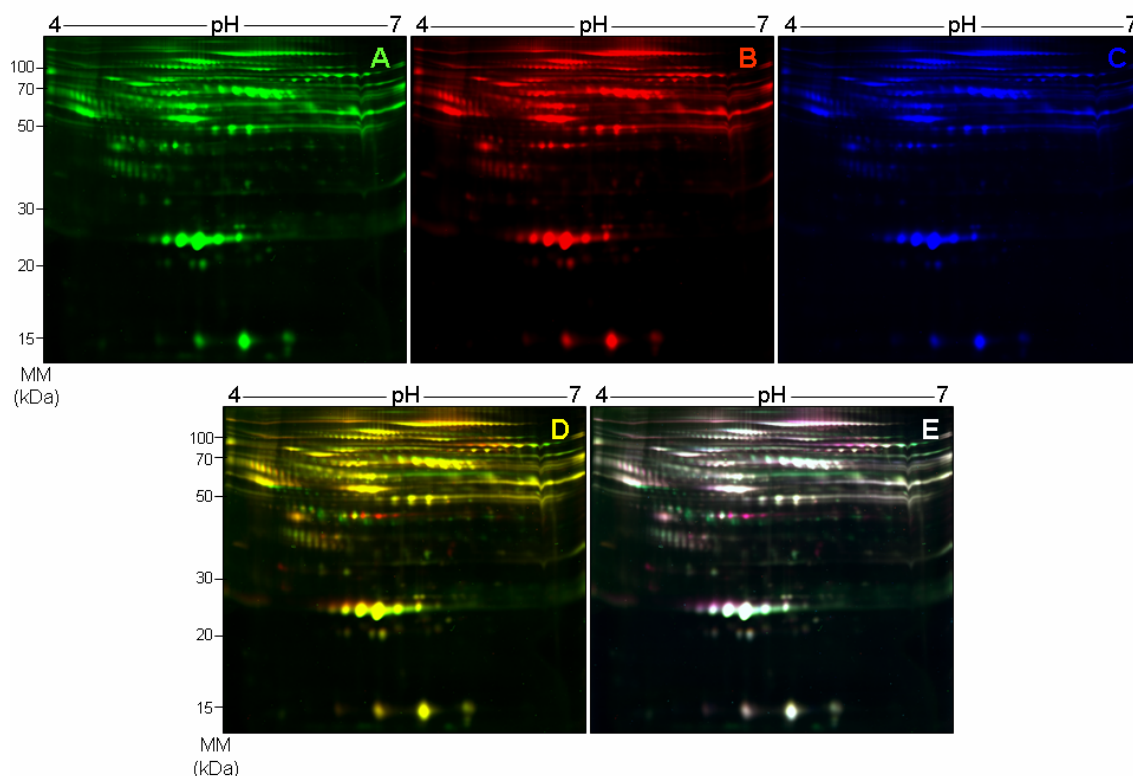


Figura R_09: Experimento 2D-DIGE: (primera dimensión, IPG pH 4-7 de 18cm; segunda dimensión, 12% acrilamida) en el que se compara el plasma deplecionado de un paciente con SCA con individuo sano. (A) Plasma deplecionado de un individuo sano marcado con Cy3. (B) Plasma deplecionado de un paciente, marcado con Cy5. (C) Control interno (mezcla de las dos muestras anteriores) marcado con Cy2. (D) Superposición de las imágenes A y B. (E) Superposición de las imágenes A, B y C.

En esta ocasión decidimos no analizar las fracciones no retenidas del plasma mediante esta técnica. Sin embargo, sí se realizó una comparación entre el plasma deplecionado y la fracción retenida del plasma de un único individuo en un mismo gel (figura R_10). La superposición de las dos imágenes corrobora nuevamente la diferencia existente entre las dos muestras, cuyos patrones bidimensionales no comparten ningún punto.

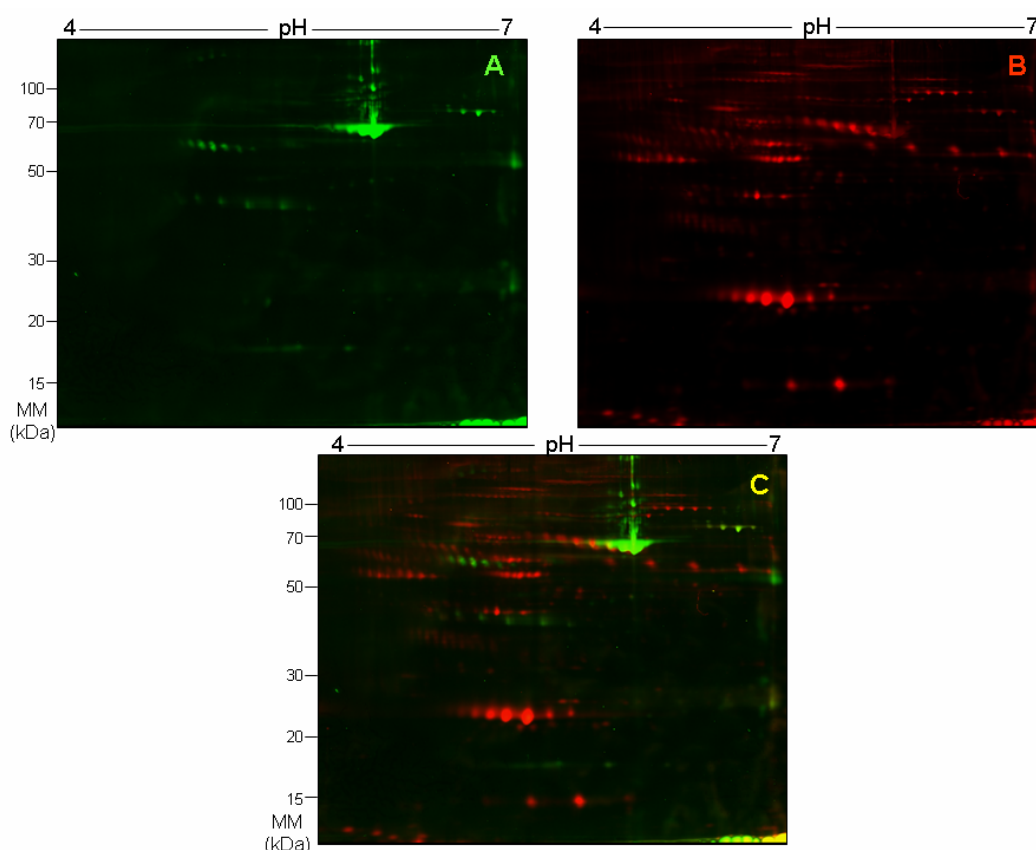


Figura R_10: Comparación mediante 2D-DIGE de los patrones proteicos del plasma deplecionado y de la fracción retenida (primera dimensión, IPG pH 4-7, 24cm; segunda dimensión, gradiente 10-16% acrilamida). (A) Plasma deplecionado marcado con Cy3. (B) Fracción retenida marcada con Cy5. (C) Superposición de las imágenes A y B. Se observa una ausencia casi total de coincidencias entre los dos patrones.

4. Análisis comparativo de los geles bidimensionales

Una vez establecidos los protocolo para la realización de la electroforesis bidimensional convencional (2-DE) y la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) del plasma humano deplecionado, procedimos a realizar el estudio comparativo. Para ello, disponíamos de una colección de muestras del plasma de los pacientes con SCA (tabla TR_01), cuyos monocitos habíamos analizado previamente. Recordemos que estas muestras habían sido que habían sido recogidas a diferentes tiempos (en el momento del ingreso en urgencias, a los 4 días, 2 meses y 6 meses después del episodio agudo). Estos pacientes se dividieron en dos grupos: en el primero de ellos recibieron un tratamiento convencional, mientras que en el otro fueron tratados con Atorvastatina 80mg/d durante los dos primeros meses, tras los cuales todos ellos pasaron a recibir un mismo tratamiento. Todas estas muestras debían ser comparadas con los dos grupos control, uno compuesto por voluntarios sanos y otro por pacientes estables. Todos los grupos incluidos en el estudio presentaron una distribución de edad y sexo sin diferencias significativas (apartado 1 de Materiales y Métodos).

4.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional)

En primer lugar se estudiaron los pacientes que habían recibido un tratamiento convencional, de manera que se compararon los geles bidimensionales de las muestras de todos los grupos, a excepción de los que habían recibido en tratamiento con Atorvastatina, con los geles bidimensionales de los dos grupos control (sanos y estables).

4.1.1. Análisis mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE).

Para realizar el análisis comparativo mediante PDQuest, se creó el experimento que aparece detallado en la tabla TR_11 y que incluía entre 6 y 10 geles por grupo de estudio. Tras la obtención de las imágenes digitalizadas de los geles teñidos con plata, estos se procesaron con el programa PDQuest 2-D Analysis Software según se detalla en Materiales y métodos. Se seleccionó el rango de masa molecular entre 0 y 60 kDa, puesto que el solapamiento, saturación y baja resolución de las manchas en la región superior impedían al programa una correcta detección y cuantificación de las mismas. Tras la detección automática de puntos y el emparejamiento de los mismos en todos los geles, se realizó una revisión manual pormenorizada y, finalmente, se incluyeron 703 manchas proteicas en el estudio. A continuación, el programa realizó el densitometrado y normalización de los datos para comparar la expresión diferencial de las manchas entre los diferentes grupos analizados. Por último, los datos obtenidos mediante PDQuest fueron exportados para poder realizar la prueba de ANOVA mediante el programa SPSS.

Sanos	Estables	T= 0	T=4 días	T=2 meses	T=6 meses
S5	M1	4A	5B	5C	5D
S10	M2	5A	6B	6C	6D
S12	M3	6A	10B	10C	10D
S18	M4	10A	15B	15C	15D
S19	M5	15A	21B	21C	21D
SM1	M6	21A	26B	26C	26D
SM2	M7	26A			
SM3	M10	30A			
SM4	M11	45A			
SM5	M12	50A			

Tabla TR_11: Diseño experimental del análisis de plasma deplecionado mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) de pacientes con SCA (tratamiento convencional). La tabla detalla las muestras y grupos experimentales incluidos en el estudio.

Resultados

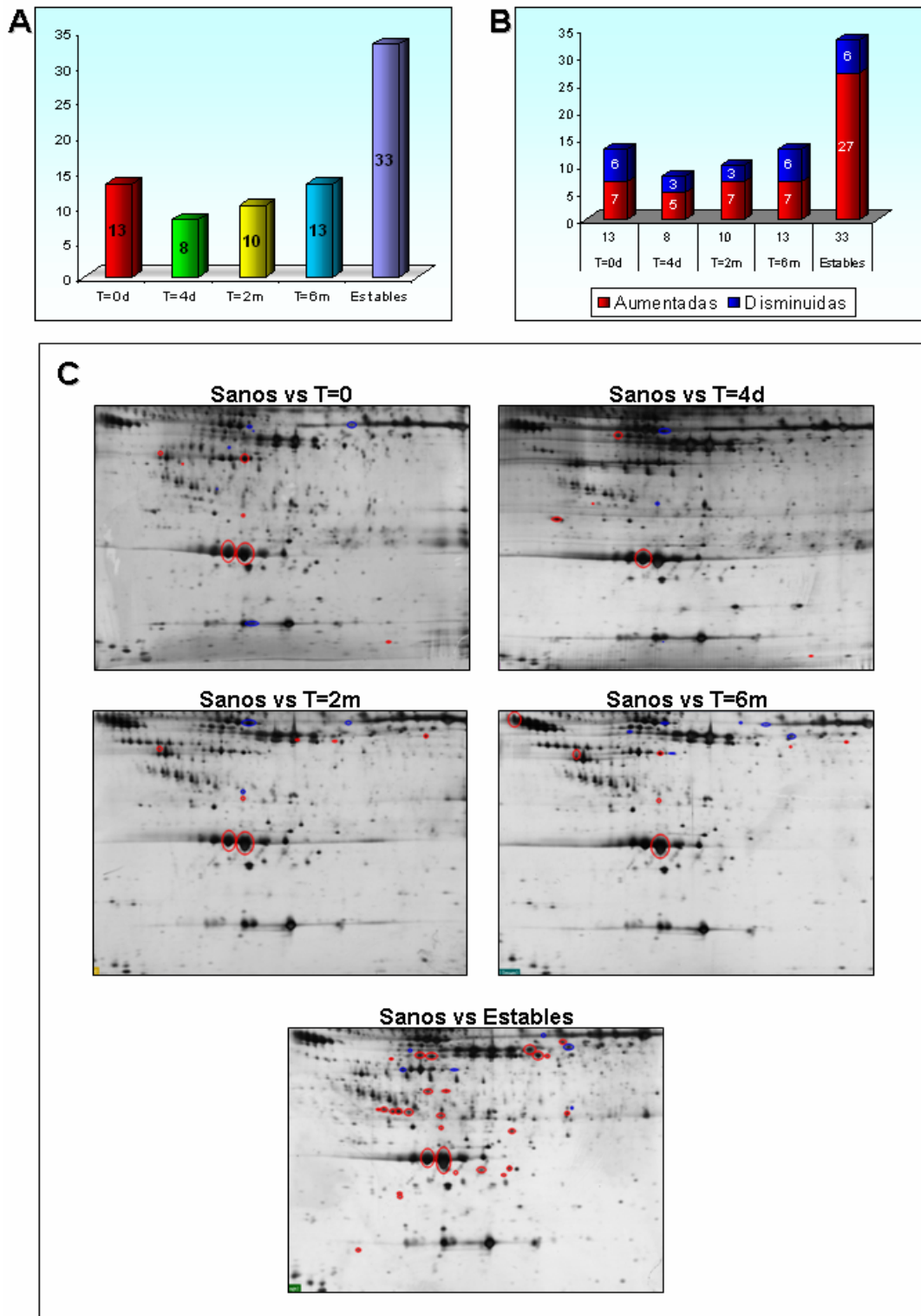


Figura R_11: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) entre el grupo control sanos, los pacientes con SCA (a excepción de los tratados con Atorvastatina) y los pacientes estables. (A) Gráfica representativa del número de manchas con variaciones significativas en sus niveles de expresión respecto al grupo control sanos. (B) En este caso se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo y disminuciones en azul) detectadas en cada grupo. (C) Imágenes de geles bidimensionales sobre las que aparecen señaladas las manchas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión para cada grupo (en rojo las manchas que aumentan y en azul las que disminuyen respecto al grupo control). T=0: momento del ingreso; T=4d: cuatro días después; T=2m: dos meses después; T=6m: seis meses después.

4.1.1.1. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de voluntarios sanos.

Tras el procesamiento de los datos importados al paquete estadístico SPSS, el resultado de la prueba de ANOVA mostró alteraciones en la expresión de algunas manchas proteicas en los pacientes con SCA y pacientes estables, respecto de los individuos sanos (figura R_11). Detectamos una expresión diferencial estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en 13 manchas en los pacientes T=0, de los cuales 7 están aumentadas, mientras que los 6 restantes se ven disminuidas respecto al grupo control sanos. En los pacientes T=4d, las variaciones significativas se reducen a 8 manchas (5 aumentadas y 3 disminuidas respecto a los sanos). Sin embargo, en los pacientes T=2m aparecen 10 diferencias significativas (7 manchas aumentadas y 3 disminuidas respecto a los sanos) y en los pacientes T=6m el número de alteraciones significativas se eleva a 13 (7 manchas aumentadas y 6 disminuidas respecto al grupo control sanos). Esta ligera tendencia al alza se dispara dramáticamente al comparar los sanos con los pacientes estables, en los que la expresión de 33 manchas proteicas aparece significativamente alterada (27 de ellas aumentadas y 6 disminuidas en los estables respecto a los sanos). En total, 52 manchas proteicas mostraron alguna alteración estadísticamente significativa en sus niveles de expresión.

4.1.1.2. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de pacientes estables.

Decidimos estudiar también las diferencias de expresión entre el grupo control formado por los pacientes estables y los grupos de pacientes con SCA tomados a diferentes tiempos (figura R_12). La prueba de ANOVA indicó en esta ocasión la existencia de 37 manchas cuya expresión se encuentra significativamente alterada ($p < 0.05$) en los pacientes T=0, 13 de las cuales están aumentadas y 24 disminuidas en los pacientes respecto al grupo de estables. Las variaciones significativas se elevan a 39 en los pacientes T=4d (17 aumentadas y 22 disminuidas respecto a los estables), mientras que en los pacientes T=2m aparecen 36 manchas con alteraciones significativas en sus niveles de expresión (17 manchas aumentadas y 19 disminuidas respecto al grupo de estables). Por último, en los pacientes T=6m, las cifras vuelven a ser idénticas a las detectadas en el momento del ingreso (37 alteraciones, estando 13 manchas aumentadas y 24 disminuidas respecto a los estables), aunque las manchas variadas no son exactamente las mismas.

Resultados

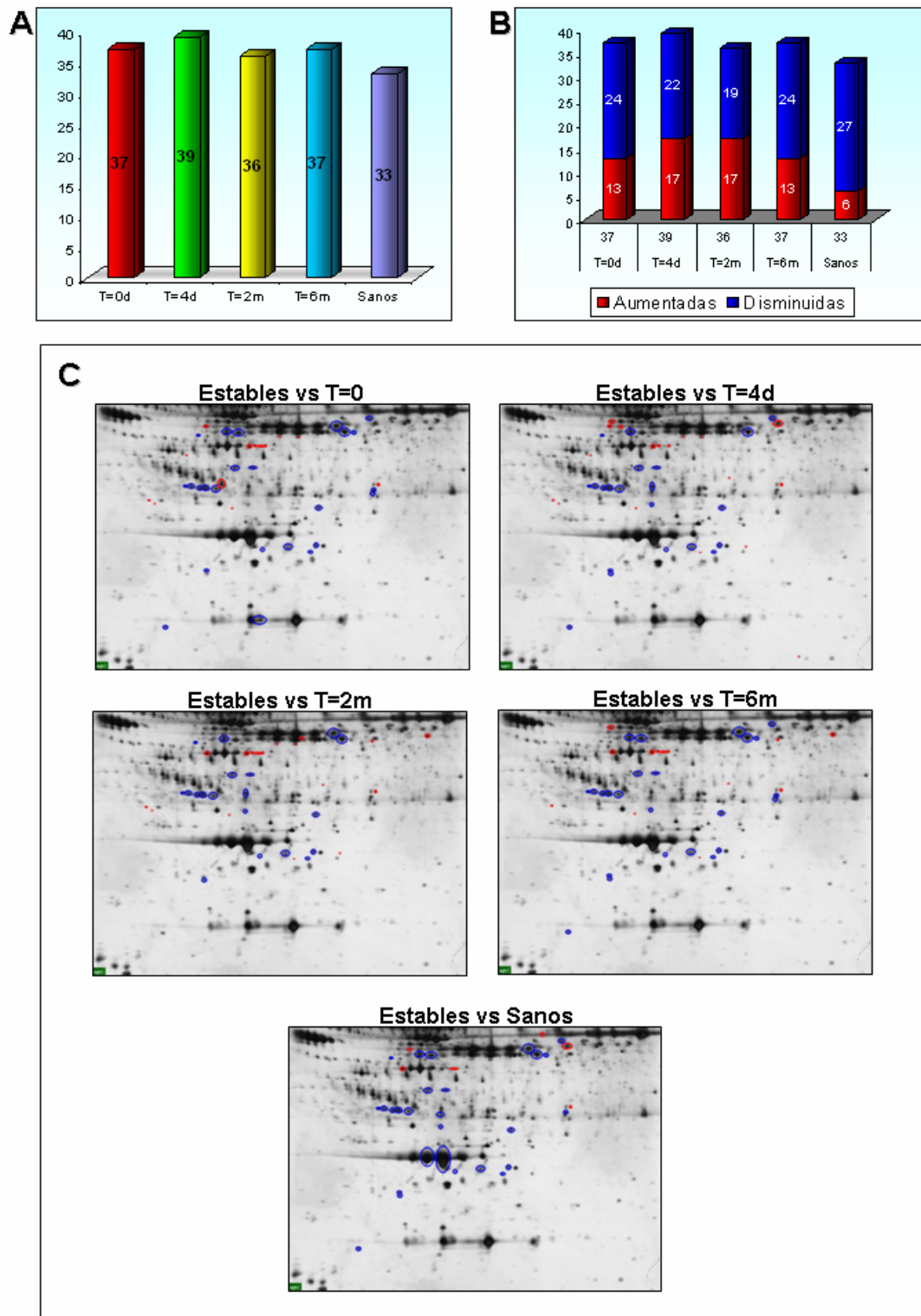


Figura R_12: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) entre el grupo de pacientes estables, los pacientes con SCA (a excepción de los tratados con Atorvastatina) y los sanos. (A) Gráfica representativa del número de manchas con variaciones significativas en sus niveles de expresión respecto al grupo de estables. (B) En este caso se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo y disminuciones en azul) detectadas en cada grupo. (C) Imágenes de geles bidimensionales sobre las que aparecen señaladas las manchas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión para cada grupo (en rojo las manchas que aumentan y en azul las que disminuyen respecto al grupo de pacientes estables). T=0: momento del ingreso; T=4d: cuatro días después; T=2m: dos meses después; T=6m: seis meses después.

Cabe recordar que las diferencias entre los dos grupos control (sanos y pacientes estables) se elevan a 33, mientras que al tomar como referencia los estables, consideramos que los niveles de expresión de 27 manchas disminuyen y, por el contrario, se elevan los de 6 de ellas en los sanos. En esta comparación, el número total de manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión ascendió a 55.

4.1.2. Análisis mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE).

Sanos	Estables	T= 0	T=4 días	T=2 meses	T=6 meses
SM2	M6	5A	26B	5C	26D
SM3	M5	6A	21B	6C	21D
S5	M4	10A	15B	10C	15D
SM5	M3	15A	10B	15C	10D
S10	M2	21A	6B	21C	6D
S19	M1	26A	5B	26C	5D

Cy3	Cy5	Cy2standard
SM2	10B	Pool (36)
M6	15C	Pool (36)
5A	10D	Pool (36)
26B	SM5	Pool (36)
5C	M3	Pool (36)
26D	15A	Pool (36)
SM3	21C	Pool (36)
M5	6D	Pool (36)
6A	S10	Pool (36)
21B	M2	Pool (36)
6C	21A	Pool (36)
21D	6B	Pool (36)
S5	5D	Pool (36)
M4	S19	Pool (36)
10A	M1	Pool (36)
15B	26A	Pool (36)
10C	5B	Pool (36)
15D	26C	Pool (36)

Tabla TR_12: Diseño experimental del análisis de plasma deplecionado mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) de pacientes con SCA (tratamiento convencional). La tabla resume las muestras (detallando el marcaje con el fluorocromo correspondiente) y los grupos experimentales incluidos en el estudio.

Dadas las ventajas que presenta la 2D-DIGE respecto a la 2-DE convencional a la hora de realizar estudios comparativos, decidimos realizar de nuevo el mismo experimento utilizando esta técnica. Para ello, se incluyeron 6 muestras por cada grupo de estudio en el diseño experimental detallado en la tabla TR_12, según el cual cada gel contendría 2 muestras diferentes y un control interno. Se prepararon 18 geles de los que se obtuvieron 54 imágenes digitalizadas: 36 correspondientes a las muestras incluidas y los 18 controles internos que permitirían al programa “DeCyder Differential Analysis Software” la co-detección de los puntos en cada gel, su emparejamiento con el resto de los geles y la normalización de las cuantificaciones. A pesar de que el número de manchas detectadas por DeCyder en estos geles era similar al detectado por PDQuest para los geles convencionales, la distribución de las mismas era diferente. En este caso, al contrario de lo que ocurría en los geles teñidos con plata, las manchas localizadas en la región superior del gel se resolvían mucho mejor y el programa era capaz de detectarlas adecuadamente. En consecuencia, la mayoría de las manchas detectadas se encontraban en el rango de masa molecular entre 60 y 120 kDa, mientras que en la región por debajo de 60 kDa se visualizaban menos que en los geles convencionales, por lo que en esta ocasión se analizaron las imágenes de los geles completos, incluyendo 777 manchas proteicas en el estudio.

4.1.2.1. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de voluntarios sanos.

Tras la detección de las manchas proteicas y el emparejamiento de las mismas, el programa DeCyder realizó la prueba de ANOVA, que reveló nuevamente cambios en los niveles de expresión de varias manchas proteicas en los pacientes con SCA y pacientes estables, respecto de los individuos sanos (figura R_13). En los pacientes T=0 hallamos alteraciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la expresión de 15 manchas respecto a los sanos, 12 de las cuales aumentan en los pacientes mientras que sólo 3 disminuyen. Sin embargo, en los pacientes T=4d el número de variaciones significativas se eleva a 30, estando la mitad de ellas aumentadas respecto a los sanos y la otra mitad disminuidas. En los pacientes T=2m detectamos 19 manchas expresadas diferencialmente (11 aumentadas en los pacientes y 8 disminuidas respecto al grupo control sanos), cifras que prácticamente se mantienen en los pacientes T=6m, donde varían 20 manchas (11 aumentadas respecto al grupo control sanos y 9 disminuidas).

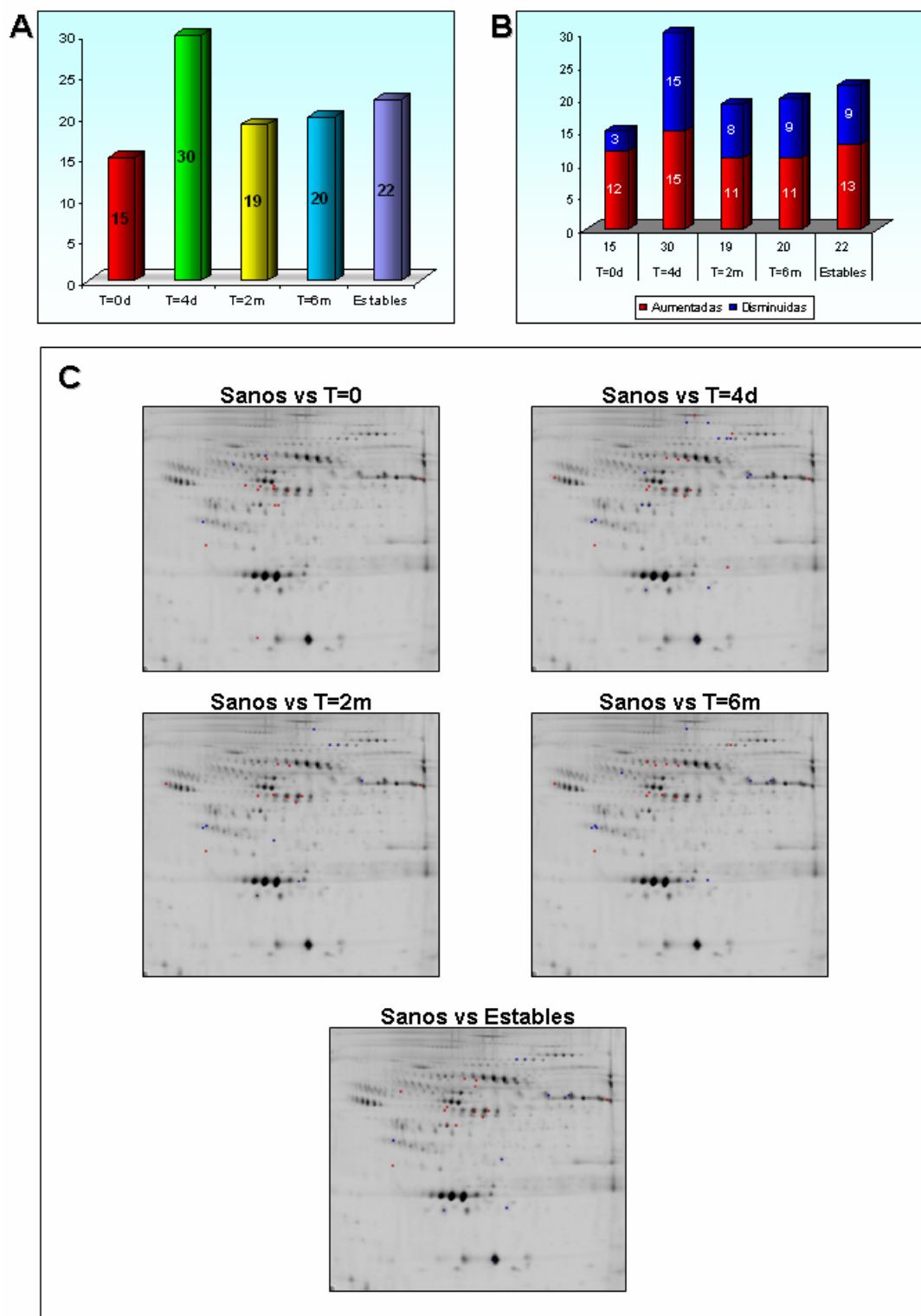


Figura R_13: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) entre el grupo control sanos, los pacientes con SCA (a excepción de los tratados con Atorvastatina) y los pacientes estables. (A) Gráfica representativa del número de manchas con variaciones significativas en sus niveles de expresión respecto al grupo control sanos. (B) En este caso se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo y disminuciones en azul) detectadas en cada grupo. (C) Imágenes de geles bidimensionales sobre las que aparecen señaladas las manchas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión para cada grupo (en rojo las manchas que aumentan y en azul las que disminuyen respecto al grupo control). T=0: momento del ingreso; T=4d: cuatro días después; T=2m: dos meses después; T=6m: seis meses después.

Resultados

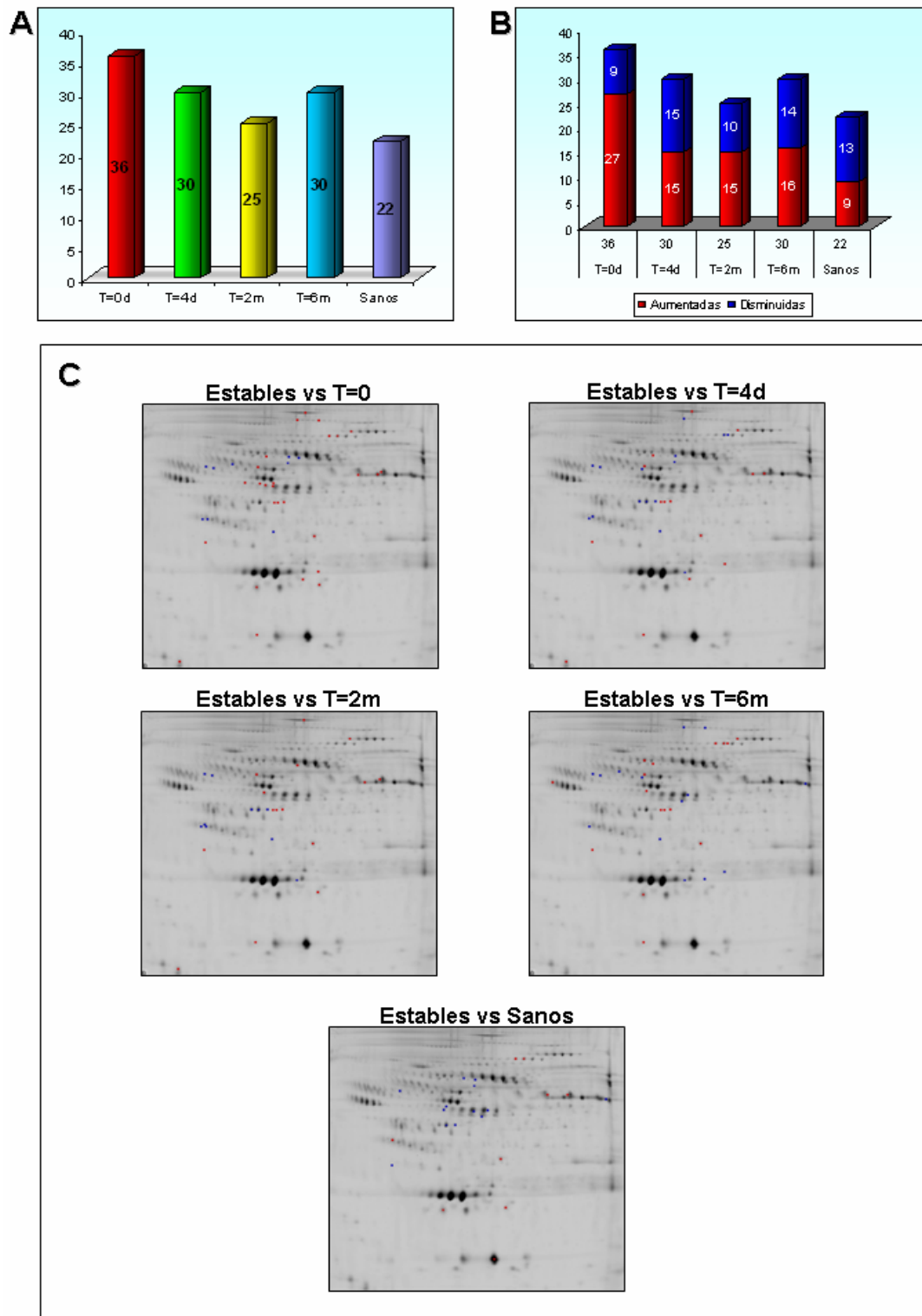


Figura R_14: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) entre el grupo de pacientes estables, los pacientes con SCA (a excepción de los tratados con Atorvastatina) y los sanos. (A) Gráfica representativa del número de manchas con variaciones significativas en sus niveles de expresión respecto al grupo de estables. (B) En este caso se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo y disminuciones en azul) detectadas en cada grupo. (C) Imágenes de geles bidimensionales sobre las que aparecen señaladas las manchas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión para cada grupo (en rojo las manchas que aumentan y en azul las que disminuyen respecto al grupo de pacientes estables). T=0: momento del ingreso; T=4d: cuatro días después; T=2m: dos meses después; T=6m: seis meses después.

Por último, en el grupo de estables los niveles de expresión de 22 manchas proteicas mostraron alteraciones significativas (aumentando 13 de ellas y disminuyendo 9) respecto a los sanos. En conjunto, 49 manchas proteicas presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas en esta comparación.

4.1.2.2. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de pacientes estables.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la varianza en esta ocasión se resumen en la figura R_14. Aparecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de 36 manchas proteicas en los pacientes T=0, estando aumentadas 27 de ellas respecto a los estables, mientras que las 9 restantes disminuyen. Las variaciones significativas se reducen primero a 30 (15 aumentadas respecto a los estables y 15 disminuidas) en los pacientes T=4d y después a 25 (15 aumentadas y 10 disminuidas respecto a los estables) en el caso de los pacientes T=2m. En los pacientes T=6m detectamos de nuevo 30 manchas diferencialmente expresadas, 16 de las cuales aumentan y 14 disminuyen respecto al grupo de pacientes estables que, como ya se detalló en el apartado anterior, presenta sólo 22 diferencias con el grupo control sanos. El número de manchas proteicas diferencialmente expresadas en conjunto ascendió a 55 en esta comparación.

4.1.2.3. Análisis Multivariante

Además de los resultados estadísticos descritos en los apartados anteriores el análisis mediante 2D-DIGE, el módulo EDA del programa DeCyder Differential Analysis Software v. 6.5 nos permite realizar un estudio estadístico avanzado, buscando patrones y relaciones en los datos de expresión obtenidos utilizando para ello análisis multivariantes y métodos de clasificación complejos.

Para realizar estos análisis avanzados, decidimos filtrar los datos de manera que pudiésemos trabajar únicamente con aquellas manchas proteicas cuya expresión diferencial fuese estadísticamente significativa. Para ello, se realizó un análisis de expresión diferencial empleando la prueba de ANOVA. De las 777 manchas proteicas incluidas en el conjunto de datos inicial, se seleccionaron aquellas que presentaban alguna alteración estadísticamente significativa en sus niveles de expresión ($p < 0.05$) y que estaban presentes en, al menos, el 80% de los mapas proteicos de las muestras (lo que en adelante, para abreviar, llamaremos “las muestras”). Así, se generó un

Resultados

subconjunto filtrado de 21 manchas proteicas, con el que se realizaron los análisis de componentes principales y análisis de patrones.

a) *Análisis de Componentes Principales (ACP)*

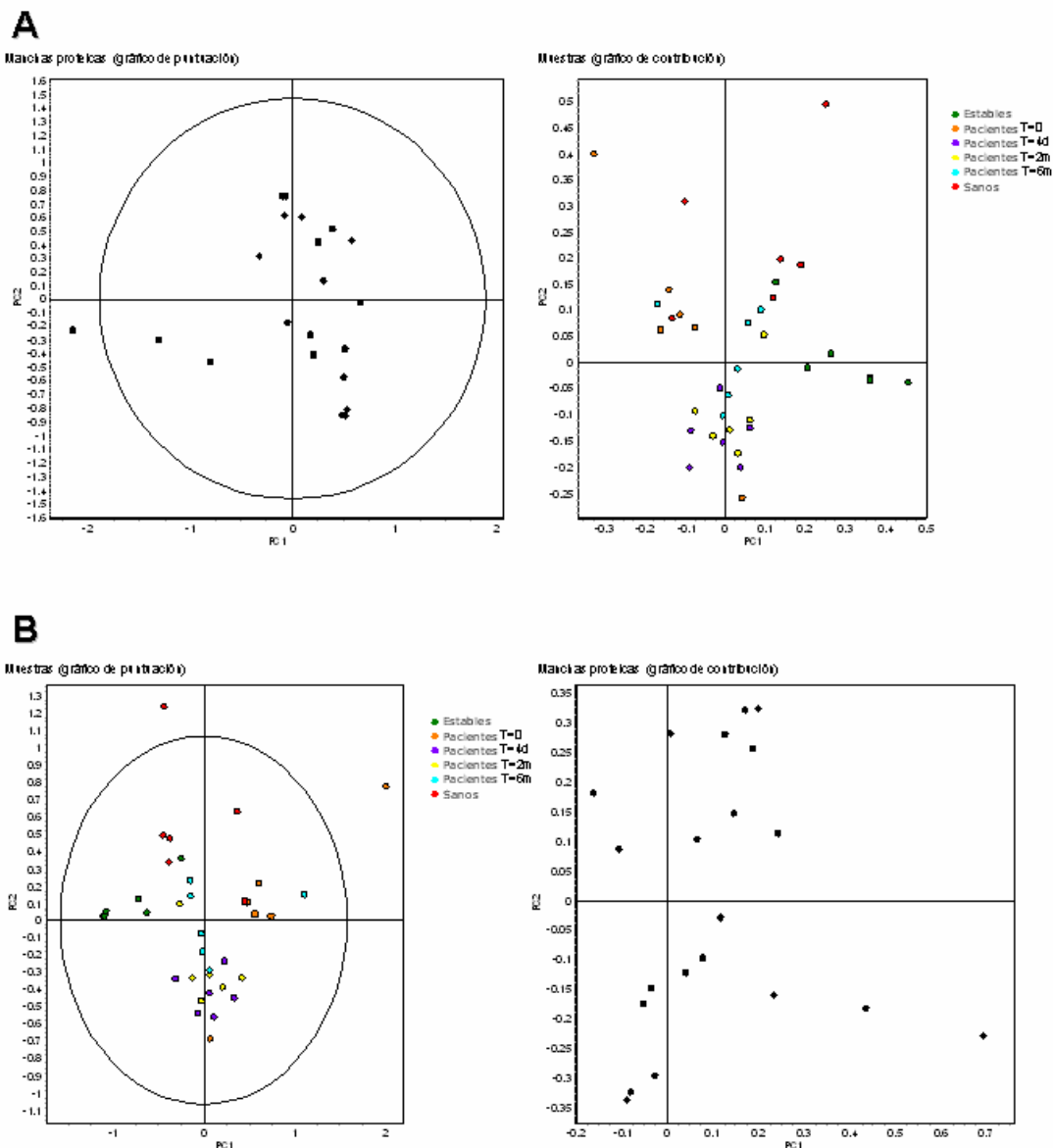


Figura R_15: Análisis de componentes principales del subconjunto de datos filtrado a partir del conjunto de datos inicial, que incluía 36 muestras y 21 manchas proteicas. (A) Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 36 muestras. El primer componente principal explica el 36.6% de la varianza y el segundo el 21.2%. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) se muestran las manchas proteicas y se puede observar la presencia de un valor extremo o atípico. En el “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) aparecen representadas las muestras. (B) Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 21 manchas proteicas. El primer componente principal explica el 42.7% de la varianza y el segundo el 19.9%. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) aparecen representadas las muestras y se puede apreciar la existencia de dos valores extremos o atípicos (una muestra perteneciente al grupo de individuos sanos y otra del grupo de pacientes T=0). El “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.

La figura R_15 muestra los resultados obtenidos tras el análisis de componentes principales (ACP) del conjunto de datos filtrado (36 muestras y 21 manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión). En el gráfico de puntuación en el que se representan las manchas proteicas (figura R_15A) aparece un valor extremo o atípico, lo que nos indica que se trata de una mancha con una expresión diferencial muy marcada. Por su parte, en el gráfico de puntuación en que aparecen representadas las muestras (figura R_15B), podemos observar que dos muestras aparecen fuera del intervalo de confianza delimitado por la elipse, lo que supone que estábamos incluyendo en el análisis dos muestras con perfiles de expresión extremos o atípicos respecto a sus respectivos grupos experimentales. Para evitar que la presencia de estas muestras pudiese alterar los resultados, decidimos seleccionar un nuevo conjunto de datos que incluyese las 21 manchas proteicas pero que excluyese las muestras con perfiles anómalos. De hecho, se eliminó una de cada grupo, para mantener el mismo número de muestras por grupo en el análisis. Con este nuevo conjunto de datos (30 muestras y las 21 manchas proteicas), se realizó un nuevo ACP, cuyo resultado se muestra en la figura R_16. Los resultados obtenidos con este nuevo subconjunto de datos no muestran valores extremos o atípicos en el gráfico de puntuación de las muestras (figura R_16B) y nos permite apreciar un cierto grado de agrupación de las mismas en cada grupo experimental: los sanos se distribuyen en los dos cuadrantes inferiores y los pacientes estables están en los cuadrantes a la izquierda del gráfico, sobre todo en el inferior; los pacientes T=0, al contrario, están distribuidos a lo largo de los cuadrantes a la derecha del gráfico, mientras que los pacientes T=4d y T=2m co-agrupan en los cuadrantes superiores (sobre todo en el superior derecho) y los pacientes T=6m se distribuyen en una diagonal desde el cuadrante superior derecho hacia el inferior izquierdo, en torno al centro del gráfico. En el caso del gráfico de puntuación que muestra las manchas proteicas (figura R_16A), volvemos a observar la presencia de un valor extremo o atípico que, en realidad es la misma mancha proteica que aparecía en la figura R_15A, lo que supone que seguimos estando ante una mancha con una expresión diferencial muy marcada. Además, relativamente cerca de esta mancha (aunque dentro del intervalo de confianza) aparecen otras dos manchas proteicas, alejadas del resto que parecen agruparse en torno al eje vertical (primer componente principal) del gráfico. Estas otras dos manchas podrían tener un patrón de expresión similar al del valor extremo o atípico.

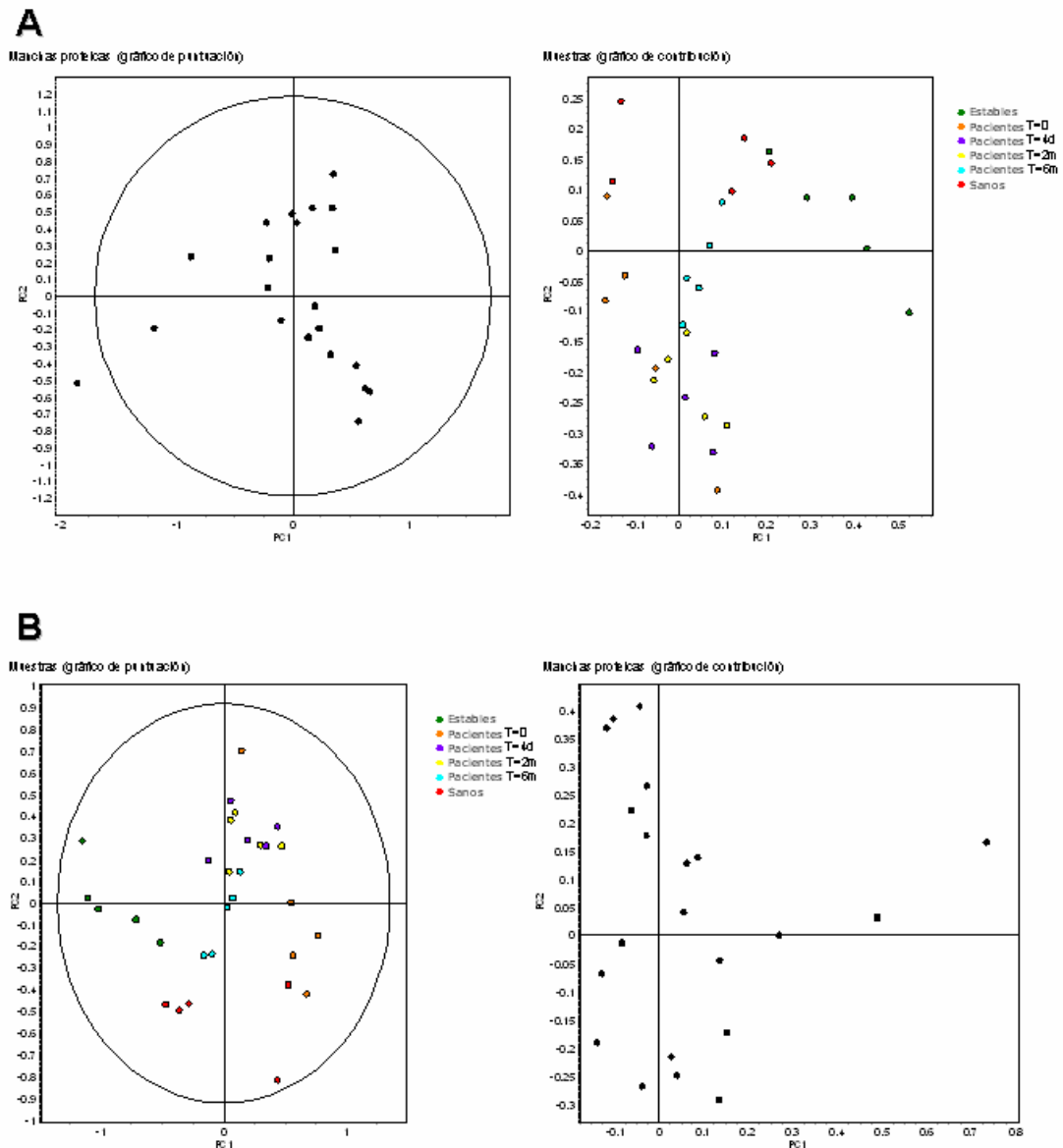


Figura R_16: Análisis de componentes principales del subconjunto de datos filtrado a partir del anterior, que incluía 30 muestras y 21 manchas proteicas. **(A)** Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 30 muestras. El primer componente principal explica el 40% de la varianza y el segundo el 19.2%. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) se muestran las manchas proteicas y se puede observar que sigue existiendo un valor extremo o atípico. En el “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) aparecen representadas las muestras. **(B)** Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 21 manchas proteicas. El primer componente principal explica el 39.5% de la varianza y el segundo el 18.7%. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) aparecen representadas las muestras. En este caso no aparece ningún valor extremo o atípico. El “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.

b) Análisis de patrones

A continuación, seleccionamos el conjunto de datos generado después del primer análisis de componentes principales (con 30 muestras y 21 manchas proteicas significativamente alteradas), que excluía las muestras con perfiles de expresión extraños que podían alterar los resultados. Sobre este conjunto de datos realizamos tres

tipos de clasificación no supervisada: Clasificación jerárquica, clasificación de k-medias y clasificación mediante mapas auto-organizativos.

- Análisis de grupos jerárquico (clasificación jerárquica).

Realizamos este análisis dos veces: en el primer caso seleccionamos la distancia Euclídea como medida de la similitud (figura R_17A), para ver los grupos que se formaban según los valores absolutos de expresión y en el segundo caso seleccionamos el coeficiente de Pearson (figura R_17B), para ver si había diferencias al clasificar según las tendencias de expresión. En ambos casos podemos observar un cierto grado de agrupación en las muestras (como ocurría en el ACP) y también en las manchas proteicas, aunque se distribuyen de manera diferente en uno y otro caso. En el análisis que utiliza la distancia Euclídea para estimar la similitud (figura R_17A), el dendrograma parece dividir las muestras en tres grupos: el primero de ellos (a la derecha del panel) está formado por los estables (en el extremo), junto con una gran parte de los sanos y dos pacientes T=6m. El segundo grupo (en el centro) engloba la mayoría de los pacientes T=0, intercalados con algunos sanos y el tercer grupo contiene una mezcla de los pacientes T=4d, T=2m y T=6m. Por su parte, el dendrograma que clasifica las manchas proteicas muestra dos grupos principales: uno bien diferenciado que agrupa tres manchas (en el extremo inferior del panel) y otro grande que podría dividirse en otros tres subgrupos. Cuando utilizamos el coeficiente de Pearson como medida de la similitud (figura R_17B), en el dendrograma que representa las muestras aparecen de nuevo tres grupos que son prácticamente los mismos que en el caso anterior, pero ordenados de modo diferente: en este caso, el grupo de los pacientes con SCA T=4d, T=2m y T=6m se mantiene en el extremo izquierdo (aunque el orden de las muestras dentro del grupo está variado), mientras que en el extremo derecho aparece el grupo que contiene la mayoría de los pacientes T=0 mezclados con algunos sanos. El grupo en el que se incluyen los pacientes estables y el resto de los sanos está en el centro. En cuanto a las manchas proteicas, esta vez podemos observar que aparecen 5 grupos aparentemente más homogéneos (o más uniformes entre sí) respecto a los grupos definidos por la clasificación Euclídea.

Resultados

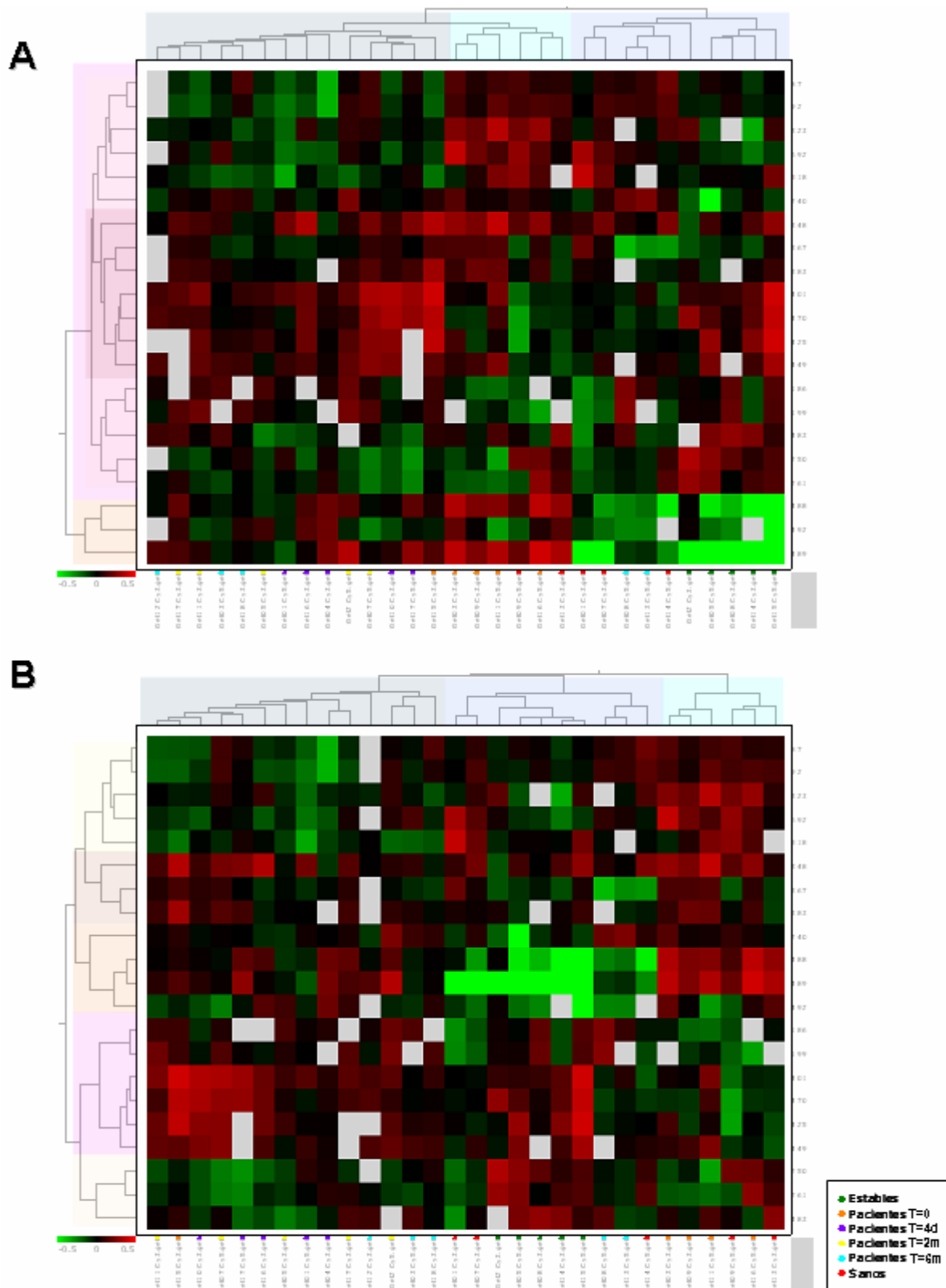


Figura R_17: Diagramas de calor obtenidos tras la clasificación jerárquica de los datos. El dendrograma horizontal muestra la clasificación de las muestras, mientras que el dendrograma vertical corresponde a las manchas proteicas. (A) Similitud estimada mediante la distancia Euclídea. (B) Similitud estimada mediante el coeficiente de Pearson.

- Análisis de grupos de k-medias (clasificación de k-medias).

El programa encontró en nuestro conjunto de datos dos categorías en las que repartió las 21 manchas proteicas según sus patrones de expresión, formando dos grupos (figura R_18). Observamos un grupo que incluye 18 manchas (Grupo 1) con perfiles de expresión muy heterogéneos y, por tanto, con un valor “q” muy pequeño (q: 8.5), mientras que el otro grupo (Grupo 2) está formado sólo por 3 manchas que presentan unos perfiles de expresión muy semejantes entre ellas, lo que se refleja en su valor “q” (q: 78.5).

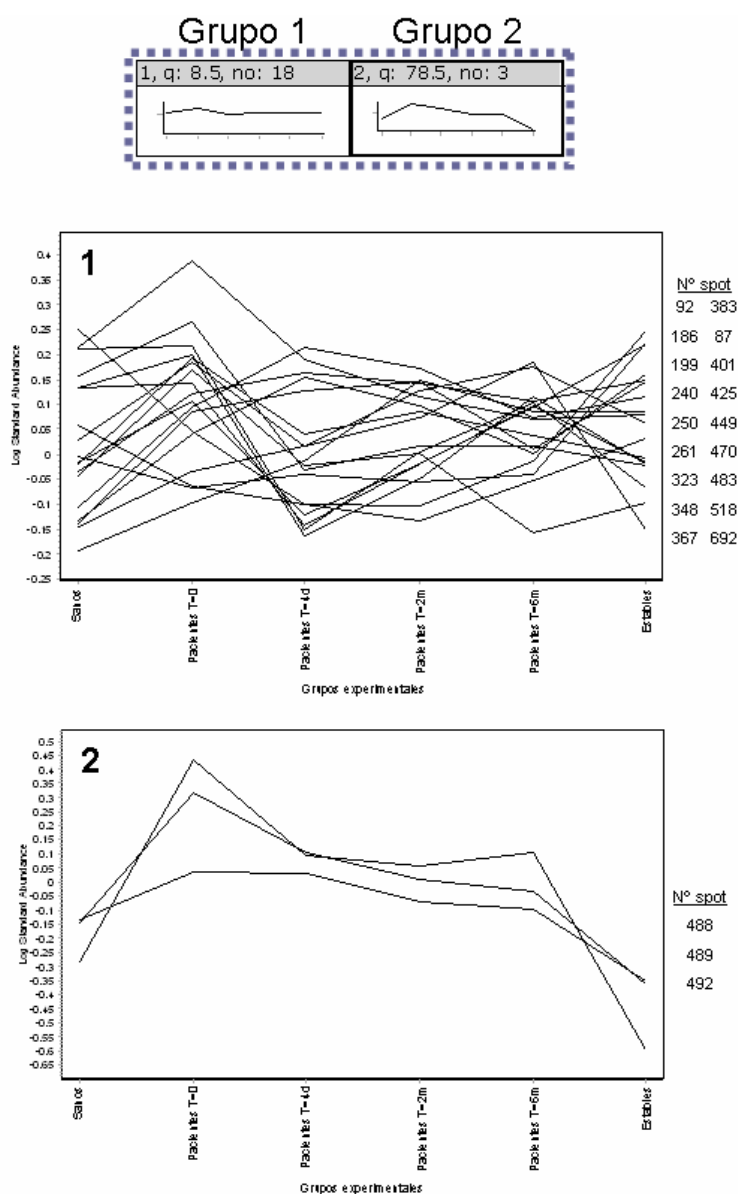


Figura R_18: Resultados de la clasificación de k-medias. El programa encontró dos categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una) en las que repartió las 21 manchas proteicas según sus patrones de expresión, formando los dos grupos (1 y 2). Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. En cada uno de ellos aparecen representados los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes al grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico.

Resultados

- Mapas auto-organizativos (“Self Organizing Maps”, SOM).

En este caso, al igual que en la clasificación jerárquica, pudimos realizar el análisis de dos maneras diferentes, calculando la similitud según la distancia Euclídea (figura R_19) y mediante el coeficiente de Pearson (figura R_20). En el primer caso, el programa asignó las manchas proteicas a 6 de las 9 categorías, pero solo 4 de ellas contenían más de un elemento, por lo que podemos decir que el programa sólo detectó cuatro grupos (figura R_19), dos de los cuales (Grupo 1, con 2 manchas y Grupo 3, con 3 manchas) presentaban un buen valor “q” (71.3 y 78.5 respectivamente). Curiosamente, el Grupo 3 es idéntico al Grupo 2 obtenido en la clasificación de k-medias e incluso tiene el mismo valor “q”.

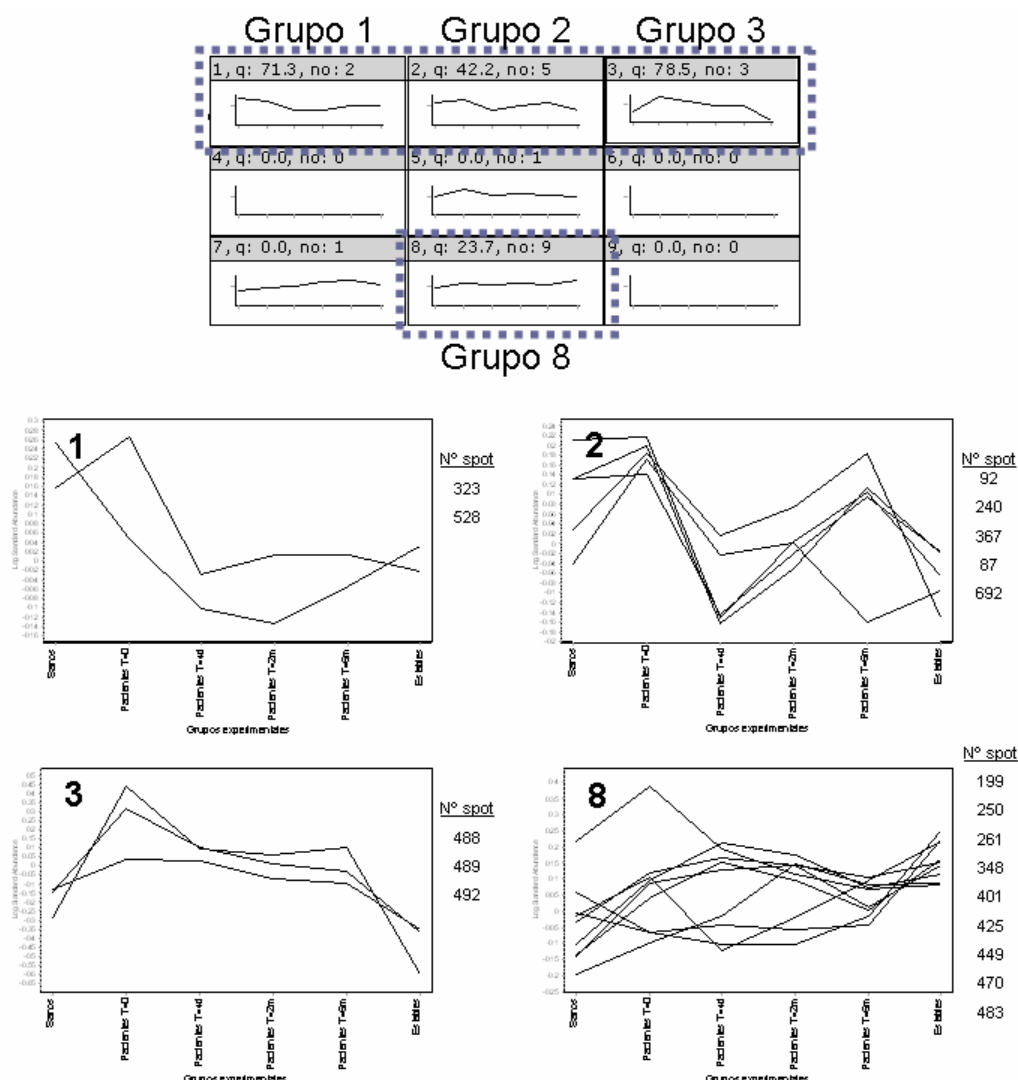


Figura R_19: Resultados de la clasificación mediante Mapas auto-organizativos, utilizando como medida de la similitud la distancia Euclídea. El programa asignó las 21 manchas proteicas a 6 de las 9 categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una), formando cuatro grupos. Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. Cada uno de ellos muestra los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes al grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico.

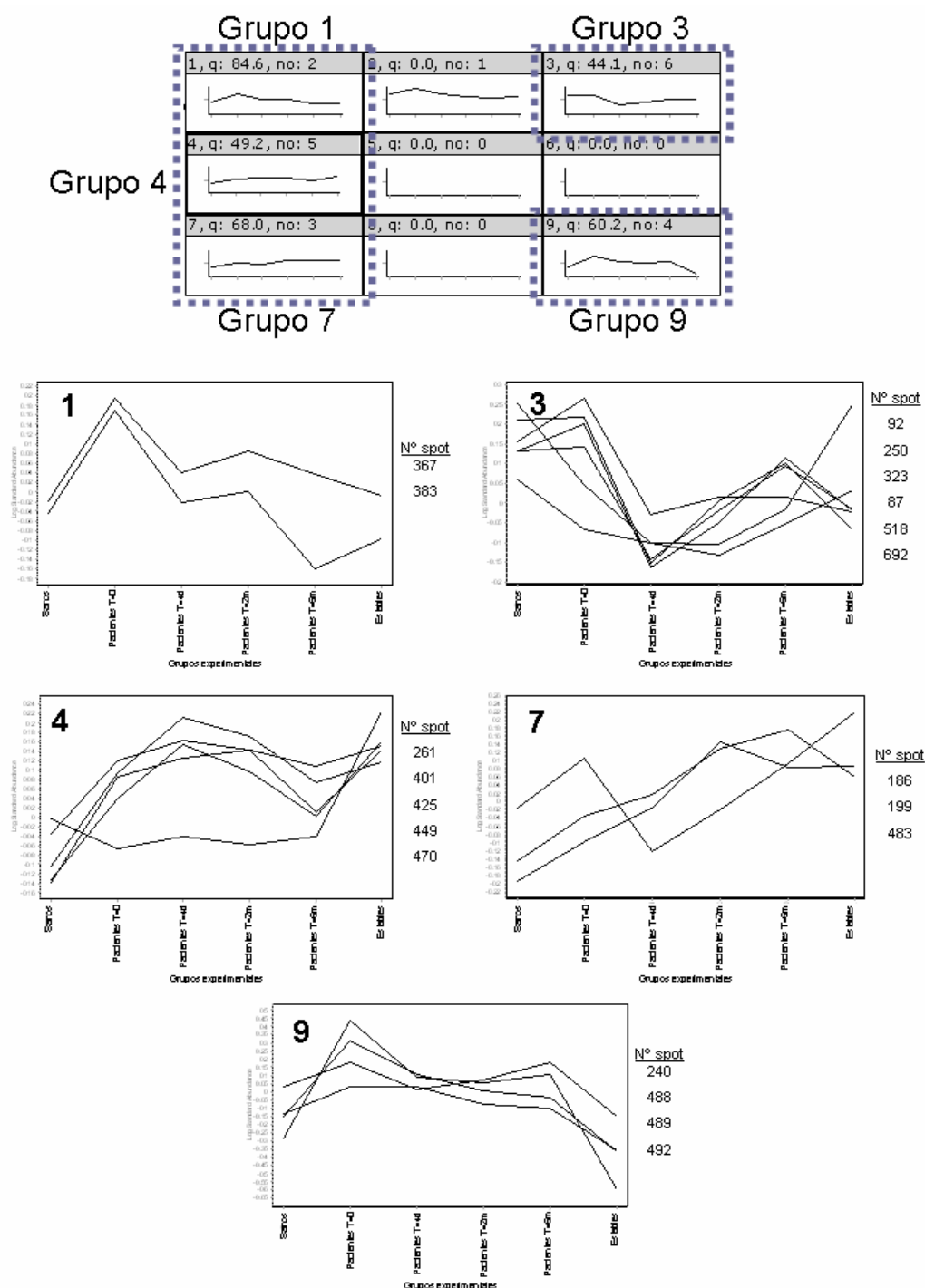


Figura R_20: Resultados de la clasificación mediante Mapas auto-organizativos, utilizando como medida de la similitud el coeficiente de Pearson. El programa volvió a repartir las 21 manchas proteicas en 6 de las 9 categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una), formando en este caso cinco grupos. Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. Cada uno de ellos muestra los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes a cada grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico.

Cuando se repitió el análisis utilizando el coeficiente de Pearson como medida de la similitud (figura R_20), el programa volvió a asignar las manchas proteicas a 6 de las 9 categorías, pero en esta ocasión fueron 5 los grupos que encontró. Uno de ellos (Grupo1, con 2 manchas) presentaba un muy buen valor “q” (84.6) y dos más (Grupo 7,

Resultados

con 3 manchas y Grupo 9, con 4 manchas) tuvieron un valor “q” menor (68.0 y 60.2 respectivamente).

4.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina).

En esta ocasión, de nuevo nos interesaba saber si existían diferencias entre el grupo tratado con Atorvastatina y el grupo que había recibido la terapia convencional, por lo cual comparamos las muestras de los pacientes que habían recibido el tratamiento con Atorvastatina [pacientes T=2m(+ATV)] con las de aquellos que recibieron tratamiento convencional (pacientes T=2m) y con el grupo control (sanos).

4.2.1. Análisis mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE).

Para realizar este análisis, decidimos incluir el nuevo grupo (pacientes tratados con Atorvastatina durante los 2 meses posteriores al episodio agudo) dentro del experimento anterior. La tabla TR_13 resume el experimento resultante, que contenía nuevamente entre 6 y 10 geles por grupo de estudio.

Sanos	Estables	T= 0	T=4 días	T=2 meses	T=6 meses	T=2 meses (+ATV)
S5	M1	4A	5B	5C	5D	23Catv
S10	M2	5A	6B	6C	6D	34Catv
S12	M3	6A	10B	10C	10D	35Catv
S18	M4	10A	15B	15C	15D	37Catv
S19	M5	15A	21B	21C	21D	38Catv
SM1	M6	21A	26B	26C	26D	39Catv
SM2	M7	26A				
SM3	M10	30A				
SM4	M11	45A				
SM5	M12	50A				

Tabla TR_13: Diseño experimental del análisis de plasma deplecionado mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina). La tabla detalla las muestras y grupos experimentales incluidos en el estudio.

Las imágenes digitalizadas de los geles teñidos con plata fueron procesadas utilizando el programa PDQuest 2-D Analysis Software (ver Materiales y métodos). Al igual que en el apartado 4.1.1, se analizaron las regiones de masa molecular inferior a 60 kDa. Tras el densitometrado y normalización de los datos, estos fueron exportados al programa SPSS mediante el cual se realizó la prueba de ANOVA y los resultados obtenidos aparecen representados en la figura R_21. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control sanos y los pacientes T=2m (tratamiento

convencional) se mantuvieron en 10 manchas (7 manchas aumentadas y 3 disminuidas respecto a los sanos). La expresión de 9 de estas 10 manchas se normalizó en los pacientes tratados con Atorvastatina [pacientes T=2m(+ATV)], mientras que la mancha restante no solo no se normalizaba, sino que su expresión estaba aún más aumentada respecto a los sanos que en los pacientes T=2m. Por otra parte, en los pacientes tratados con Atorvastatina aparecieron 9 manchas proteicas diferencialmente expresadas respecto a los sanos (3 aumentadas y 6 disminuidas), que no estaban alteradas en los pacientes T=2m. Este análisis detectó en total 19 manchas proteicas diferencialmente expresadas.

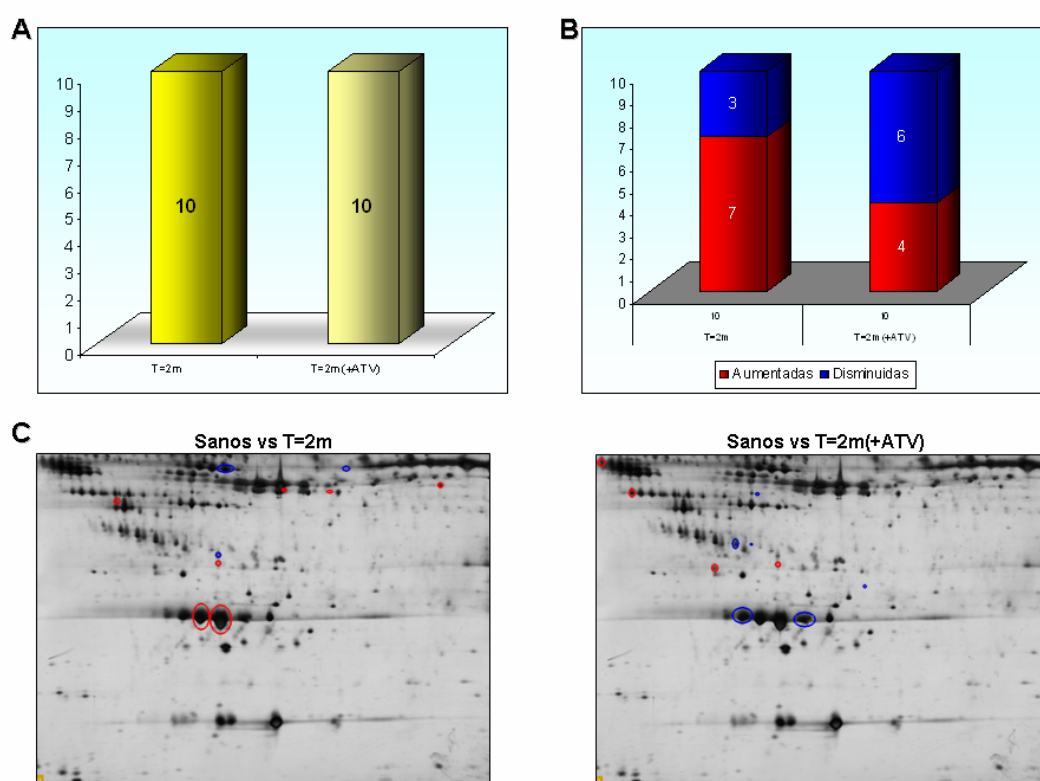


Figura R_21: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) entre el grupo control sanos, los pacientes T=2m y T=2m(+ATV). (A) Gráfica representativa del número de manchas con alteraciones significativas de sus niveles de expresión respecto al grupo de controles sanos. (B) En este caso se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo y disminuciones en azul) detectadas en cada grupo. (C) Imágenes de geles bidimensionales sobre las que aparecen señaladas las manchas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión para cada grupo (en rojo las manchas que aumentan y en azul las que disminuyen respecto al grupo control). T=2m: muestras obtenidas 2 meses después del SCA de pacientes que recibieron el tratamiento convencional. T=2m(+ATV): muestras obtenidas 2 meses después del SCA de pacientes que recibieron el tratamiento con Atorvastatina.

4.2.2. Análisis mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE).

Debido a las características del propio sistema DIGE, en este caso no fue posible incluir las nuevas muestras dentro del experimento anterior, por lo que se diseñó un nuevo experimento (detallado en la tabla TR_14) incluyendo, como en el caso anterior, 6 muestras por cada grupo de estudio. En esta ocasión se prepararon 9 geles de los que se obtuvieron 18 imágenes digitalizadas correspondientes a las muestras incluidas y los 9 controles internos necesarios para su procesamiento mediante el programa “DeCyder Differential Analysis Software”.

Sanos	T=2 meses	T=2 meses (+ATV)
SM2	5C	23Catv
SM3	6C	34Catv
S5	10C	35Catv
SM5	15C	37Catv
S10	21C	38Catv
S19	26C	39Catv

Cy3	Cy5	Cy2standard
SM2	15C	Pool (18)
SM3	38Catv	Pool (18)
6C	S10	Pool (18)
10C	39Catv	Pool (18)
23Catv	SM5	Pool (18)
S19	37Catv	Pool (18)
34Catv	21C	Pool (18)
5C	S5	Pool (18)
35Catv	26C	Pool (18)

Tabla TR_14: Diseño experimental del análisis de plasma deplecionado mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina). La tabla resume las muestras (detallando el marcaje con el fluorocromo correspondiente) y los grupos experimentales incluidos en el estudio.

Tal y como ocurrió en el primer experimento 2D-DIGE, se analizaron las imágenes de los geles completos, incluyendo esta vez 876 manchas proteicas sobre las que el programa realizó el análisis de la varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos aparecen ilustrados en la figura R_22, donde se observa que el número de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) aparecidas al comparar las muestras de los pacientes T=2m (tratamiento convencional) con el grupo control sanos asciende en este caso a 29 (14 que aumentan y 15 que disminuyen). De ellas, 14 manchas fueron normalizadas por el tratamiento con Atorvastatina, mientras que las 15 restantes seguían

estando significativamente alteradas (6 disminuidas y 9 aumentadas). En algunos casos, estas variaciones en la expresión eran incluso más notables que en los pacientes T=2m respecto a los sanos. Además, el análisis mostró 4 manchas proteicas diferencialmente expresadas en los pacientes T=2m(+ATV) respecto a los sanos (aumentando una y disminuyendo las otras 3), que no estaban alteradas en los pacientes T=2m. En total, 33 manchas proteicas presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas en este análisis.

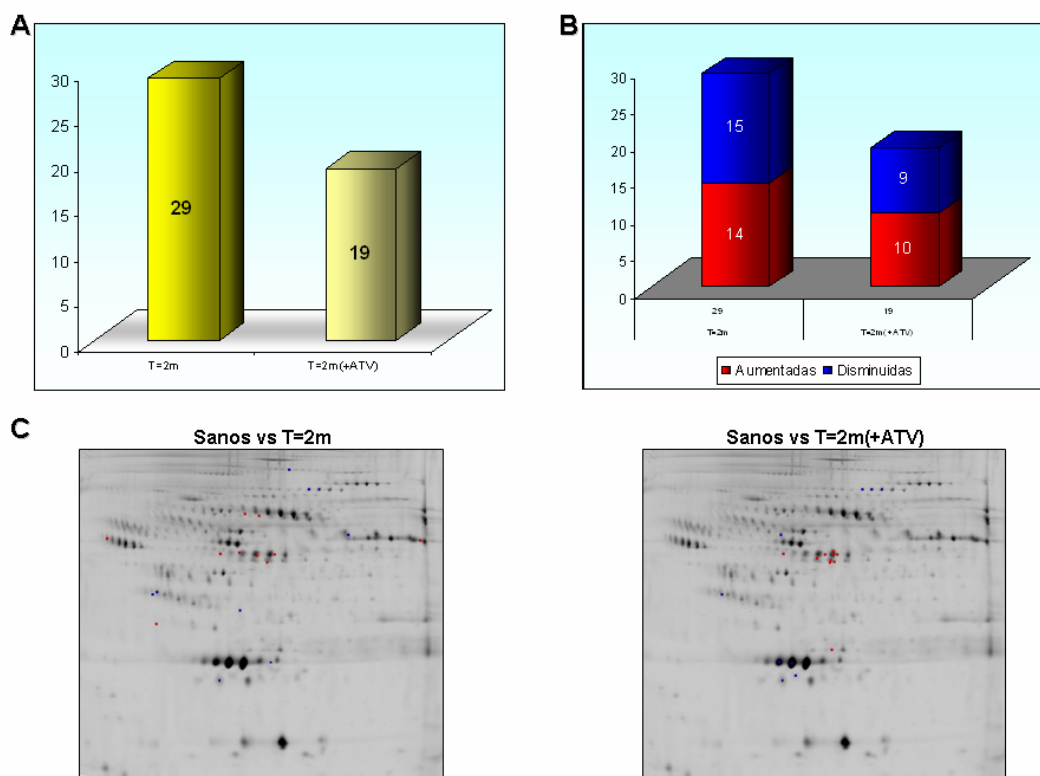


Figura R_22: Resultados de la comparación mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) entre el grupo control sanos, los pacientes T=2m y T=2m(+ATV). (A) Gráfica representativa del número de manchas con alteraciones significativas de sus niveles de expresión respecto al grupo de controles sanos. (B) En este caso se especifica el tipo de alteraciones (aumentos en rojo y disminuciones en azul) detectadas en cada grupo. (C) Imágenes de geles bidimensionales sobre las que aparecen señaladas las manchas que sufren alteraciones en sus niveles de expresión para cada grupo (en rojo las manchas que aumentan y en azul las que disminuyen respecto al grupo control). T=2m: muestras obtenidas 2 meses después del SCA de pacientes que recibieron el tratamiento convencional. T=2m(+ATV): muestras obtenidas 2 meses después del SCA de pacientes que recibieron el tratamiento con Atorvastatina.

4.2.2.1. Análisis Multivariante

Como ocurría en el apartado 4.1.2, al tratarse de un experimento 2D-DIGE el análisis mediante el módulo EDA del programa DeCyder nos permite realizar un estudio estadístico avanzado. Del mismo modo que ocurría en la ocasión anterior, lo primero que se hizo fue un análisis de expresión diferencial (empleando la prueba de ANOVA) mediante el cual filtramos los datos para trabajar con el conjunto de manchas

Resultados

proteicas diferencialmente expresadas ($p < 0.01$) y presentes en, al menos, el 80% de los mapas proteicos. De las 876 manchas iniciales, se seleccionó un conjunto filtrado de 19 manchas con las que realizaríamos el análisis de componentes principales y el análisis de patrones.

a) Análisis de Componentes Principales (ACP)

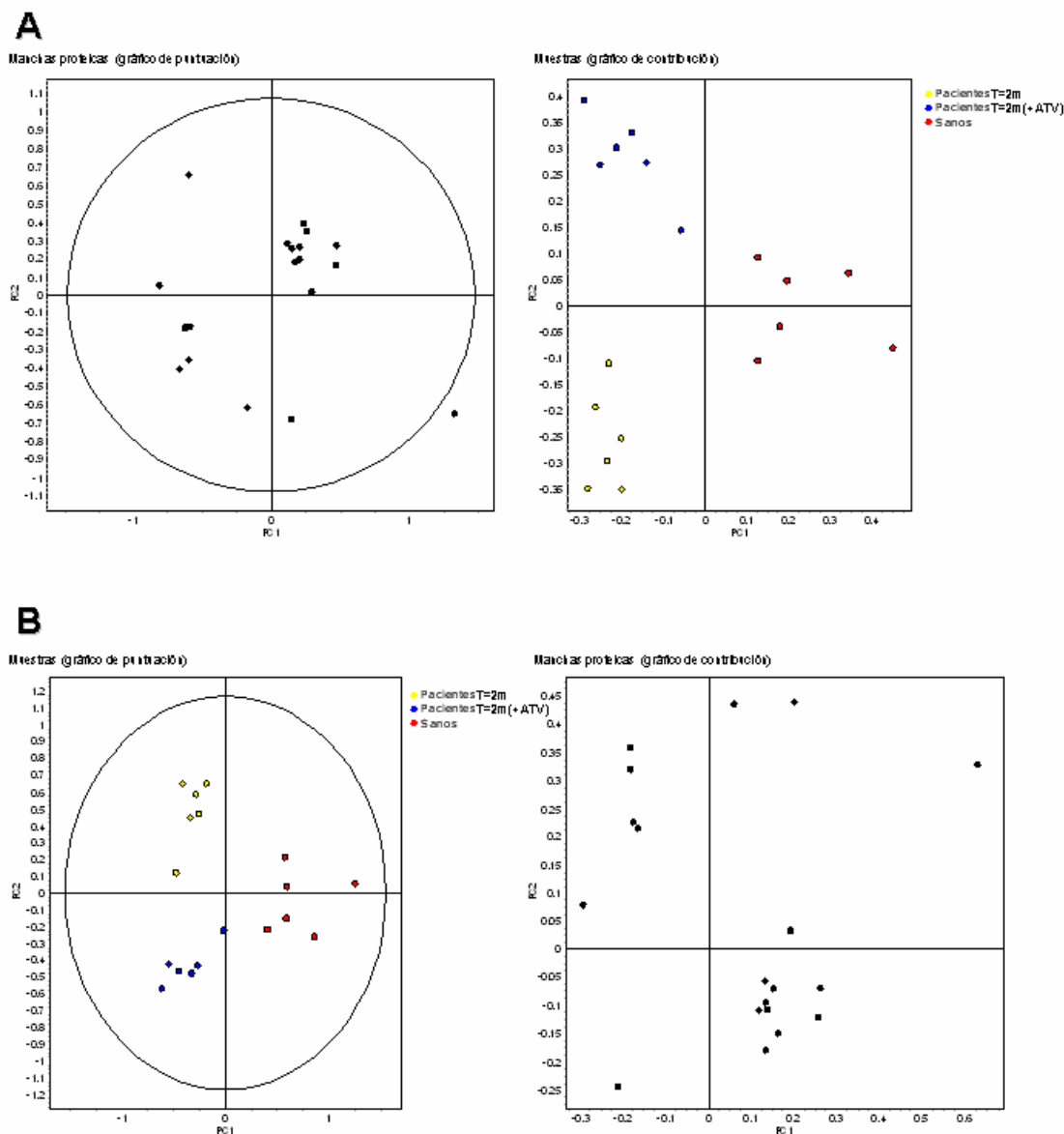


Figura R_23: Análisis de componentes principales del subconjunto de datos filtrado a partir del conjunto de datos inicial, que incluía 18 muestras y 19 manchas proteicas. (A) Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 18 muestras. El primer componente principal explica el 47.5% de la varianza y el segundo el 25.2%. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) se muestran las manchas proteicas y se puede observar que existe un valor extremo o atípico. En el “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) aparecen representadas las muestras. (B) Resultados del análisis de componentes principales calculados tomando como variables las 19 manchas proteicas. El primer componente principal explica el 46.9% de la varianza y el segundo el 26.7%. En el “gráfico de puntuación” (score plot, a la izquierda) aparecen representadas las muestras, sin que se aprecie ningún valor extremo o atípico. El “gráfico de contribución” (loading plot, a la derecha) muestra la distribución de las manchas proteicas.

Con el conjunto de datos filtrado (18 muestras y 19 manchas proteicas), se realizó el análisis de componentes principales (ACP), cuyo resultado se muestra en la figura R_23. El gráfico de puntuación (score plot) en que aparecen representadas las muestras (figura R_23B) en esta ocasión no presenta valores extremos o atípicos. Las muestras de cada grupo experimental aparecen agrupadas en tres núcleos que corresponden a los tres grupos experimentales. En el gráfico de puntuación que muestra las manchas proteicas (figura R_23A) sí aparece un valor extremo o atípico que no correspondía a una mancha mal emparejada, por lo que nuevamente debíamos encontrarnos ante un caso de expresión diferencial muy acentuada. El resto de las manchas parecen formar dos grupos diferentes y sin relación con el valor extremo o atípico, uno de ellos muy compacto en el cuadrante superior derecho y el resto en el cuadrante inferior izquierdo, aunque es un grupo mucho más disperso.

b) Análisis de patrones

Sobre este mismo conjunto de datos (18 muestras y 19 manchas proteicas), realizamos los tres tipos de clasificación no supervisada descritos anteriormente.

- Análisis de grupos jerárquico (clasificación jerárquica).

El análisis se realizó dos veces, empleando una medida de similitud diferente en cada ocasión (figura R_24). En este experimento el programa agrupó las muestras perfectamente en ambos casos, siendo idéntica incluso la ordenación de los tres grupos (el grupo de sanos a la derecha del panel, los pacientes T=2m en el centro y los pacientes T=2m(+ATV) en el extremo izquierdo). Sin embargo, la agrupación de las manchas proteicas muestra algunas variaciones entre los dos análisis. Cuando estimamos la similitud mediante la distancia Euclídea (figura R_24A) aparecieron 3 grupos principales (aunque el grupo central podríamos subdividirlo en otros tres subgrupos). En el análisis que utiliza el coeficiente de Pearson para estimar la similitud (figura R_24B), encontramos también tres grupos.

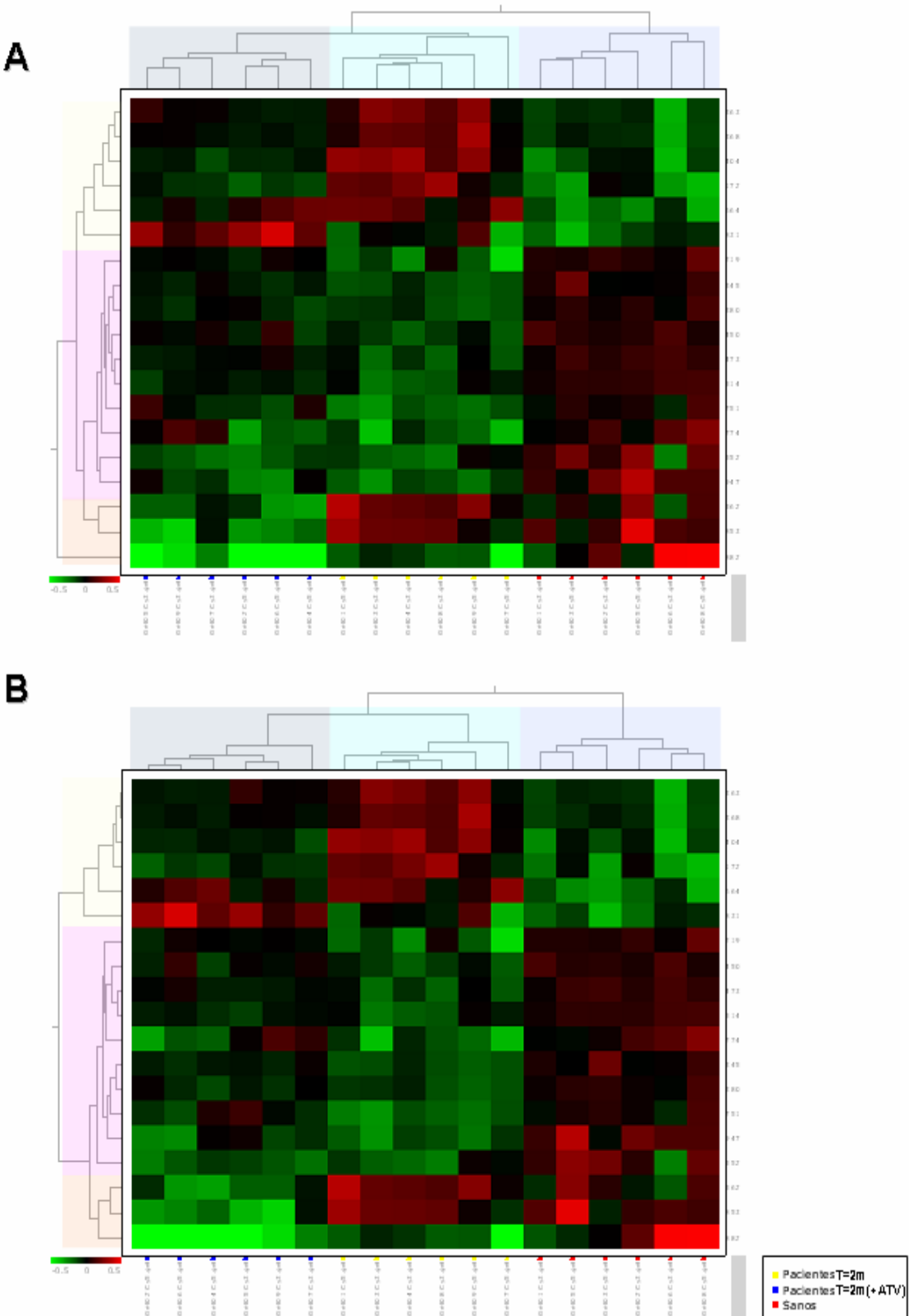


Figura R_24: Diagramas de calor obtenidos tras la clasificación jerárquica de los datos. El dendrograma horizontal muestra la clasificación de las muestras, mientras que el dendrograma vertical corresponde a las manchas proteicas. **(A)** Similaridad estimada mediante la distancia Euclídea. **(B)** Similaridad estimada mediante el coeficiente de Pearson.

- Análisis de grupos de k-medias (clasificación de k-medias).

El programa determinó la existencia de 5 categorías en las que repartió las 19 manchas proteicas según sus patrones de expresión (figura R_25), formando tres grupos (las otras dos categorías no las consideramos como grupo ya que contenían un único elemento cada una). Dos de ellos (Grupo 1 con 5 manchas y Grupo 3 con 2 manchas) obtuvieron valores “q” bastante altos (73.4 y 86.7 respectivamente), mientras que el Grupo 2 (con 10 manchas) presentó un valor “q” más discreto (58.5).

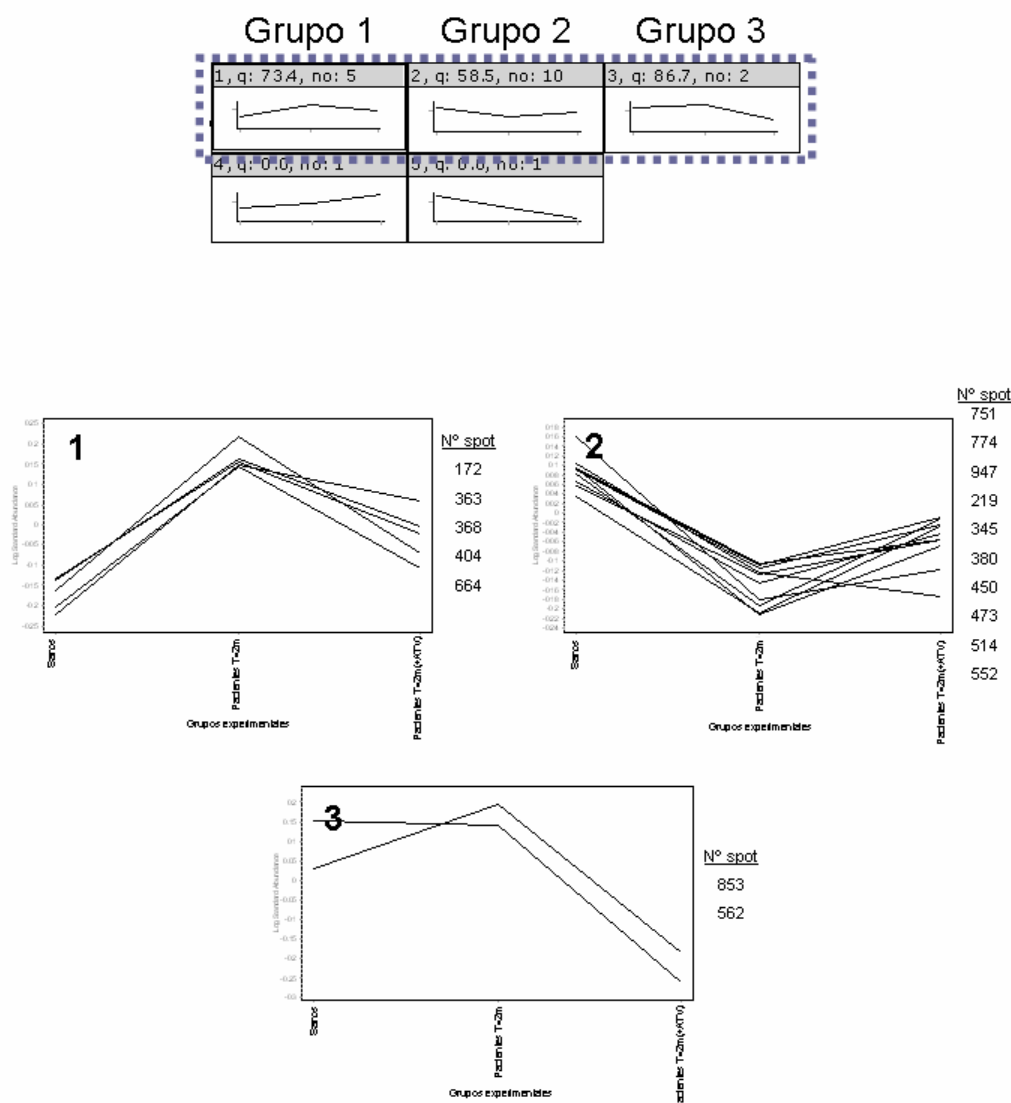


Figura R_25: Resultados de la clasificación de k-medias. El programa encontró cinco categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una) en las que distribuyó las 19 manchas proteicas según sus patrones de expresión, formando tres grupos (1, 2 y 3). Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. Cada uno de ellos muestra los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes a cada grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico.

Resultados

- Mapas auto-organizativos (“Self Organizng Maps”, SOM).

En este caso volvimos a realizar el análisis con los mismos ajustes y calculando la similitud de las dos maneras posibles (coeficiente de Pearson y distancia Euclídea).

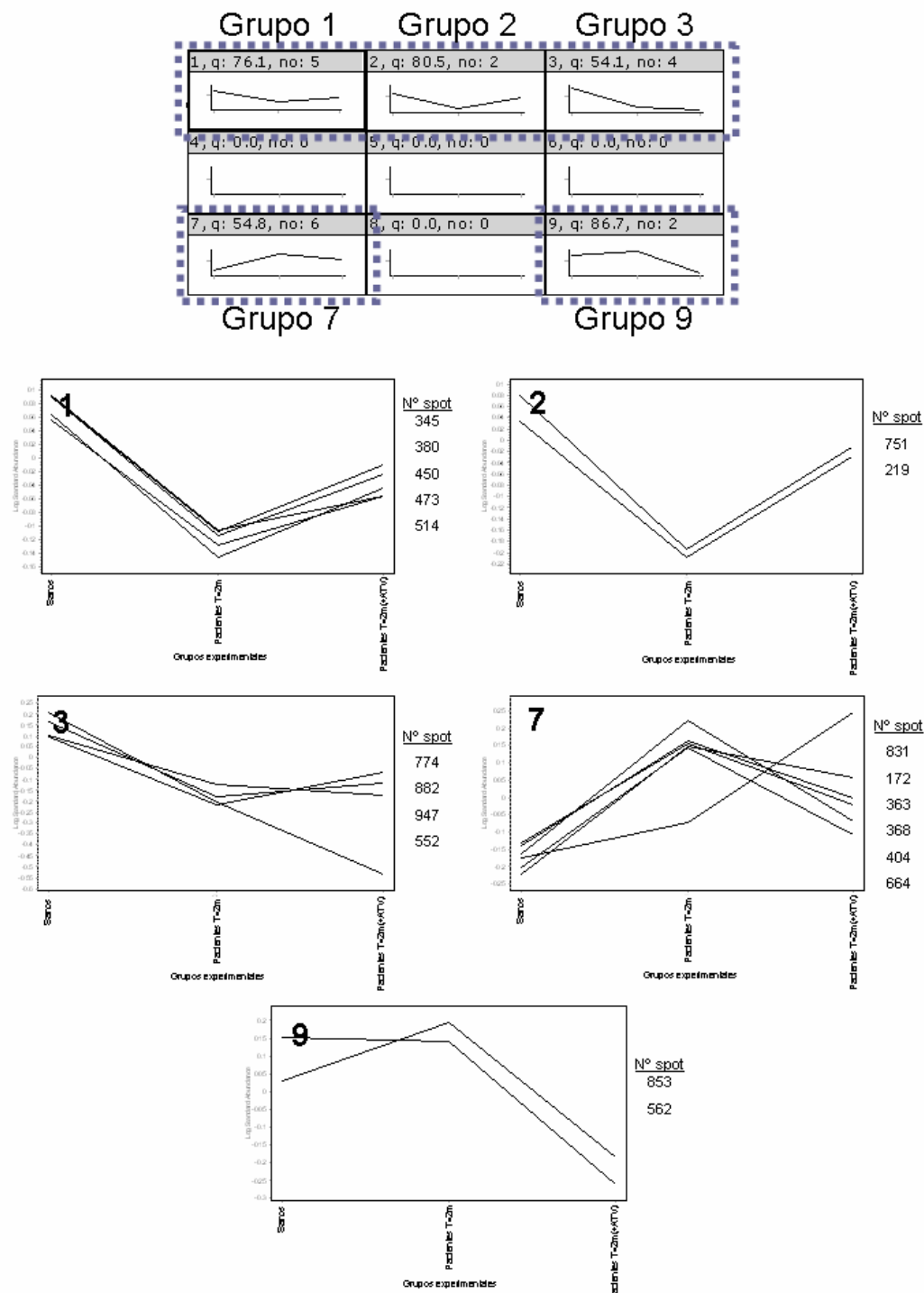


Figura R_26: Resultados de la clasificación mediante Mapas auto-organizativos, utilizando como medida de la similitud la distancia Euclídea. El programa repartió las 19 manchas proteicas en 5 de las 9 categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una), formando cuatro grupos. Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. Cada uno de ellos muestra los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes a cada grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico.

En la clasificación basada en la distancia Euclídea (figura R_26), las manchas proteicas fueron asignadas a 5 de las 9 categorías, formando cinco grupos. Tres de ellos (Grupo 1, con 5 manchas, Grupo 2 y Grupo 9, con 2 manchas cada uno) presentaron muy buenos valores “q” (76.1, 80.5 y 86.7 respectivamente), mientras que los dos restantes (Grupo 3, con 4 manchas y Grupo 6, con 7 manchas) mostraron valores “q” más discretos (54.1 y 54.8 respectivamente). Por su parte, el análisis en el que estimó la similitud mediante el coeficiente de Pearson (figura R_27), clasificó las manchas proteicas en 7 de las 9 categorías, formando tres grupos, uno de los cuales tuvo un valor “q” de 83.7 (Grupo 8, con 2 manchas), mientras que los dos restantes (Grupo 3 y Grupo 7, con 6 y 7 manchas respectivamente) tuvieron valores “q” algo menores (54.8 y 65.2).

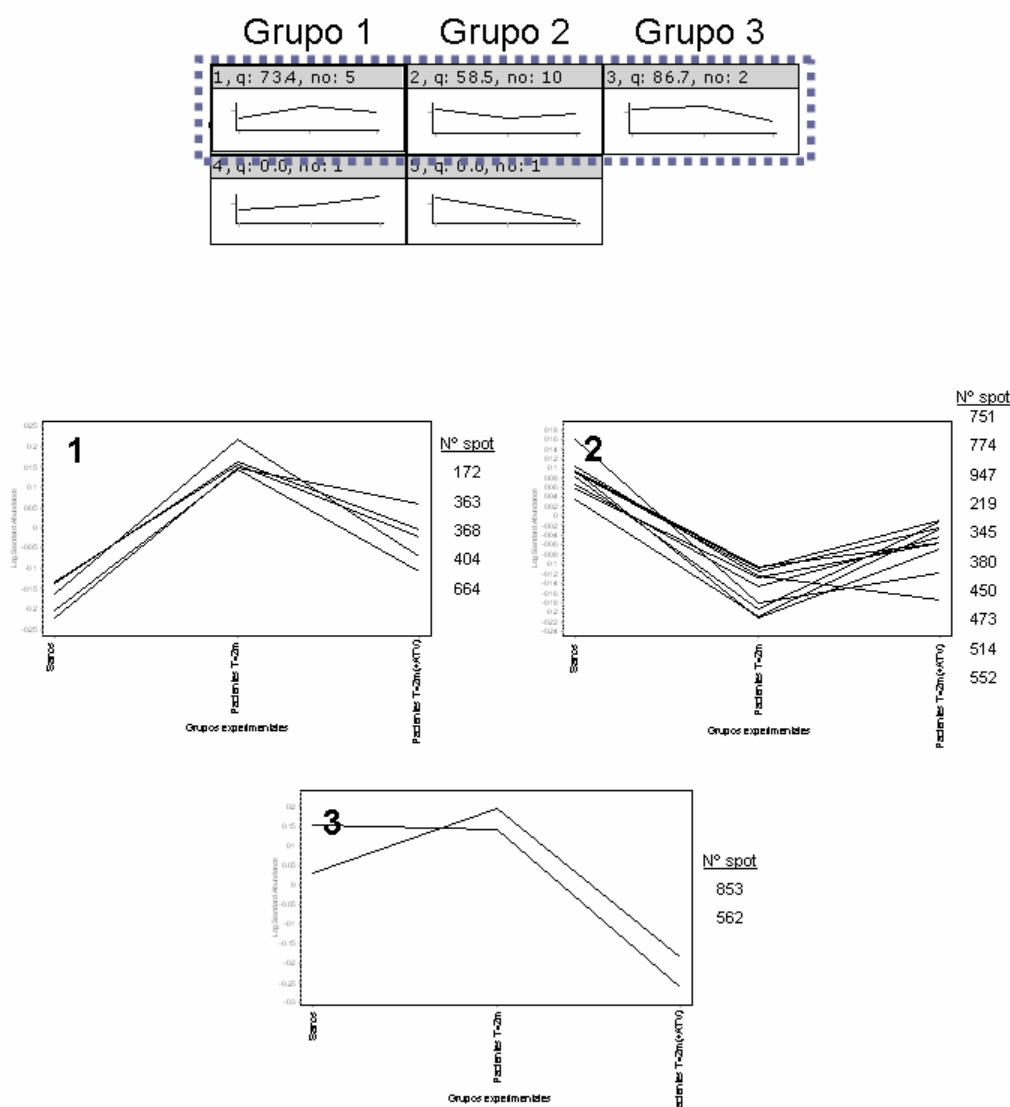


Figura R_27: Resultados de la clasificación mediante Mapas auto-organizativos, utilizando como medida de la similitud el coeficiente de Pearson. El programa asignó las 19 manchas proteicas a 7 de las 9 categorías (arriba, el cuadro de categorías muestra sus valores “q” y el número de manchas incluidas en cada una), formando en este caso cinco grupos. Los gráficos correspondientes a cada grupo aparecen numerados. Cada uno de ellos muestra los perfiles de expresión de las manchas proteicas pertenecientes a cada grupo, detalladas en la lista que aparece a la derecha de cada gráfico

5. Identificación de proteínas

Todas las manchas proteicas que mostraron alteraciones significativas de sus niveles de expresión en alguno de los análisis realizados fueron recortadas de los geles para su posterior digestión con tripsina y análisis mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF o MALDI-TOF-TOF.

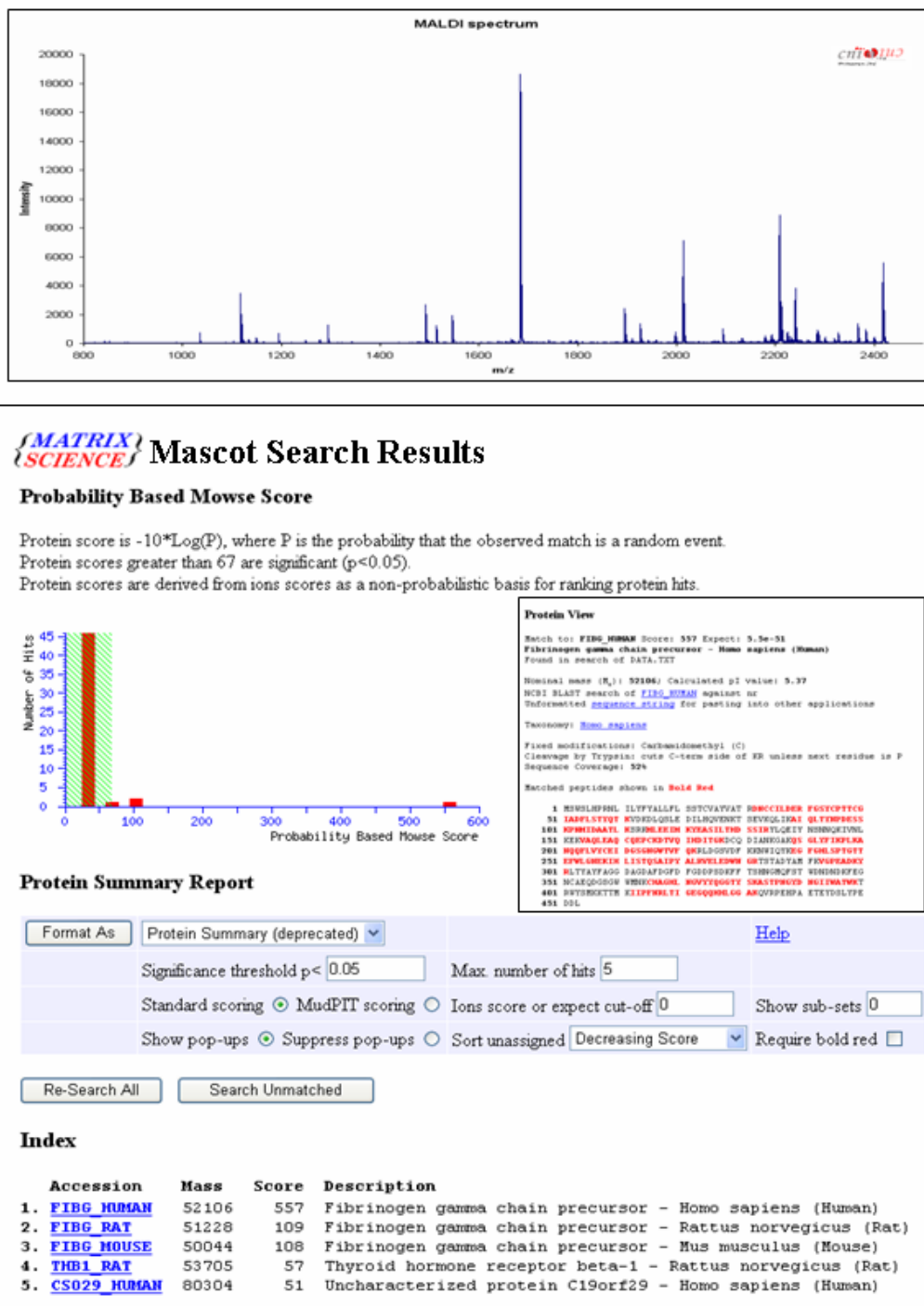


Figura R_28: Ejemplo de identificación de una mancha proteica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Arriba se muestra el espectro de masas obtenido para la mancha proteica n° 614. Abajo se muestra el resultado obtenido tras la búsqueda en MASCOT, que identificó la proteína Fibrinógeno Gamma.

Los espectros de masas obtenidos (huellas peptídicas en el caso de MALDI-TOF y espectros de fragmentación en MALDI-TOF-TOF) se utilizaron como en el caso de los monocitos para tratar de identificar las proteínas correspondientes empleando “MASCOT” (figura R_28). A continuación se detallan las identificaciones obtenidas para cada uno de los análisis realizados.

5.1. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional) mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE)

El análisis mediante 2-DE del plasma deplecionado de los pacientes con SCA que habían recibido el tratamiento convencional, los pacientes estables y los voluntarios sanos, reveló la existencia de un total de 64 manchas proteicas cuyos niveles de expresión mostraban diferencias estadísticamente significativas en la prueba de ANOVA ($p < 0.05$) en el conjunto de comparaciones realizadas (52 en la comparación con sanos y 55 en la comparación con estables). De estas 64 manchas (que aparecen numeradas en la figura R_29), 56 fueron identificadas con éxito, mientras que las 8 restantes quedaron sin identificar.

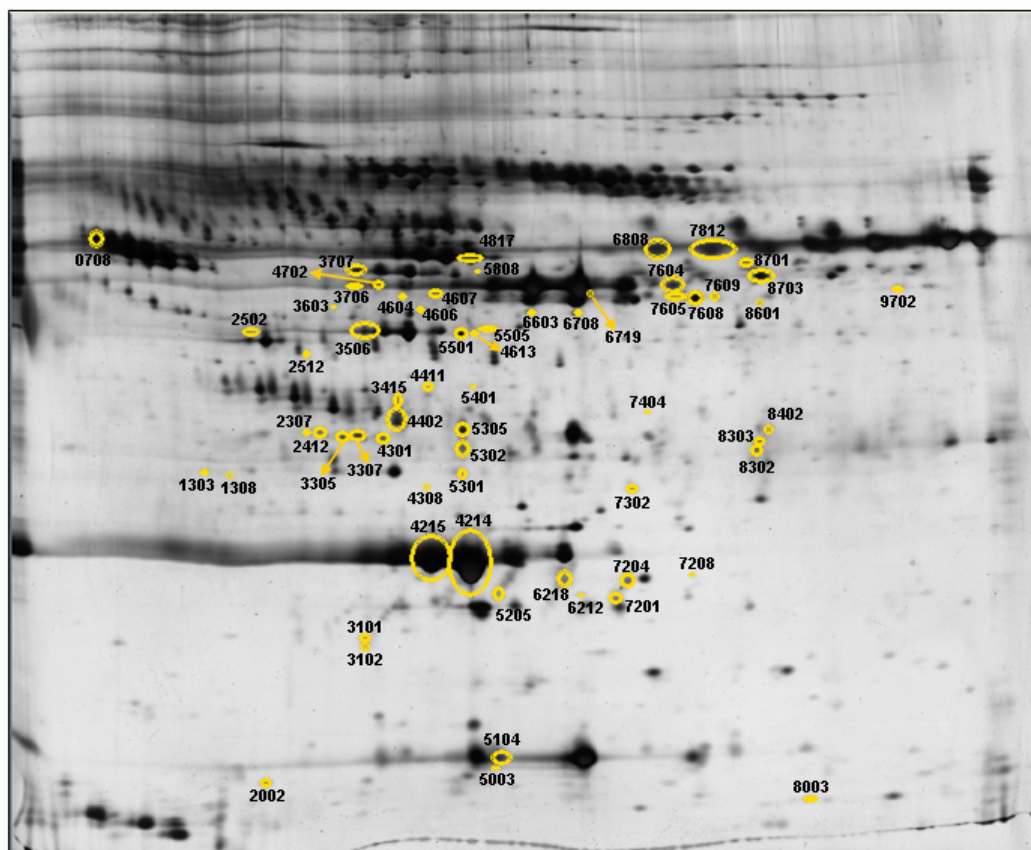


Figura R_29: Imagen representativa de un gel 2-DE sobre el que aparecen señaladas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los pacientes con SCA (que recibieron tratamiento convencional) mediante electroforesis bidimensional convencional 2-DE.

Resultados

Nº mancha	S vs T=0	S vs T=4d	S vs T=2m	S vs T=6m	S vs E	Proteína	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
708				2,81		Alpha-2-HS-glycoprotein	258	40098	5,43	10	P02765
1303		1,52				TPM4	306	27570	4,77	58	P67936
2002					2,35						
2307		1,42			3,19	Fibrinogen Gamma	117	35497	5,86	22	P02679
2412					3	Fibrinogen Gamma	165	24337	6,49	22	P02679
2502	1,66		3,03	2,34		Triosephosphate isomerase	145	27095	6,9	36	P60174
2512	1,55					Zinc-alpha-2-glycoprotein	134	34079	5,57	18	P25311
3101					2,92	Fibrinogen Gamma	112	24337			P02679
3102					2,87						
3305					2,86	Fibrinogen Gamma	150	46823	5,54	24	P02679
3307					2,42	Fibrinogen Gamma	143	52106	5,37	25	P02679
3415	-2,79										
3506					-2,66	Apolipoprotein A-IV	118	43358	5,22	19	P06727
3603					1,31	Complement C3	109	188569	6,02	1	P01024
3707		1,65				Fibrinogen Gamma	162	35497	5,86	35	P02679
4214	1,36		1,33	1,37	1,43	Apolipoprotein A-I	339	28061	5,27	70	P02647
4215	1,39	1,37	1,42		1,45	Apolipoprotein A-I	328	28061	5,27	67	P02647
4301					3,11	Fibrinogen Gamma	140	35497	5,86	29	P02679
4411					3,44						
4604					3,61						
4606	-1,43					Hemopexin	111	52385	6,55	4	P02790
4607					2,71	Vitamin D Binding Protein	141	54526	5,4	25	P02774
4702				-1,89	-2,57	Fibrinogen Gamma	114	52106	5,37	6	P02679
4817	-2,17	-2,91	-2,9	-2,35		Vitamin D Binding Protein	361	52780	5,17	47	P02774
5003		-1,73				Transthyretin; TTR	119	15991	5,52	34	P02766
5104	-2,11					Transthyretin; TTR	169	4624	8,18	59	P02766
5205					1,58	Apolipoprotein A-I	111	30759	5,56	4	P02647
5301	2,42				3,33	Complex-forming glycoprotein HC (alpha-1-microglobulin)	152	20592	5,84	13	P02760
5302			1,54	1,56	1,59	Transthyretin	108	12671	5,26	33	P02766
5305		-2,62	-2,72			Inter-alpha-trypsin inhibitor	183	103489	6,51	4	Q14624
5401					2,84						
5501	2,10			2,06		Beta-Actin	160	39446	5,78	26	P60709
5505				-1,7	-3,3	CD5 antigen-like	188	39603	5,28	44	O43866
5808	-2,39					Fibrinogen Gamma	125	52106	5,37	16	P02679
6218					2,23	Apolipoprotein A-I	177	30759	5,56	14	P02647
6719			2,19			Fibrinogen Gamma	176	46823	5,54	33	P02679
6808				-4,95		Fibrinogen Beta	174	51358	7,95	24	P02675
7201					1,6	Apolipoprotein A-I	94	30759	5,56	4	P02647
7204					3,14	Apolipoprotein A-I	100	23389	5,55	26	P02647
7302					1,81	Vitamin D Binding Protein	155	54526	5,4	26	P02774
7604					2,39	Fibrinogen Beta	167	52759	8,33	24	P02675
7605			1,34			Fibrinogen Beta	143	56577	8,54	19	P02675
7608					1,93	Fibrinogen Beta	266	40167	6,95	38	P02675
7609					2,12	Fibrinogen Beta	130	52759	8,33	20	P02675
7812	-2,28		-2,41	-2,94	-1,68	Fibrinogen Beta	94	51358	7,95	16	P02675
8003	1,89	2,14				Amyloid related serum protein SAA	162	11675	5,89	70	P02735
8303					1,95	Fibrinogen Beta	157	28040	8,16	14	P02675
8402					-2,06	Hakata antigen	203	33381	6,2	22	Q75636
8601				1,44		Pigment epithelium-derived factor	126	46484	5,97	6	P36955
8701					1,62	Hemopexin	165	52385	6,55	17	P02790
8703				-1,48	-1,42	Fibrinogen Beta	235	38081	5,84	46	P02675
9702			1,49	1,69		Hemopexin	106	45916	6,62	18	P02790

Tabla TR_15: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación del plasma deplecionado de los pacientes con SCA y el grupo control sanos mediante 2-DE, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el rojo representa aumento, el azul disminución respecto los sanos y el blanco indica que no existen diferencias. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. Mowse Score, puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoelectrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número

asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; S vs T=0, comparación de los pacientes T=0 frente a los sanos; S vs T=4d, comparación de los pacientes T=4d frente a los sanos; S vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los sanos; S vs T=6m, comparación de los pacientes T=6m frente a los sanos; S vs E, comparación de los pacientes estables frente a los sanos.

5.1.1. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de voluntarios sanos.

De las 52 manchas proteicas que mostraron alguna alteración significativa en sus niveles de expresión en esta comparación, pudimos identificar 46 de ellas mediante espectrometría de masas. La tabla TR_15 resume las alteraciones encontradas en cada comparación (en rojo las manchas proteicas aumentadas y en azul las disminuidas respecto al grupo control sanos) junto a las identificaciones correspondientes, acompañadas de la puntuación obtenida en MASCOT (Mowse score), el masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI) teóricos, la cobertura de secuencia (C.S., en %) y el número de acceso de la proteína identificada en la base de datos SwissProt (estas casillas aparecen en blanco en los casos en que la identificación no fue posible). Las 46 manchas proteicas corresponden a 19 proteínas diferentes.

5.1.2. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de pacientes estables.

En el caso de la comparación con los pacientes estables, fueron 55 las manchas proteicas diferencialmente expresadas que encontramos en total. Muchas de ellas coincidían con las detectadas en la comparación con los individuos sanos (43 en total), pero 9 de las manchas que aparecieron variadas en aquella comparación no aparecen en esta y en cambio en esta aparecen 12 manchas que no estaban en la anterior (figura R_30). De las 55 manchas variadas, no pudimos identificar 7 de ellas, mientras que las 48 restantes fueron identificadas con éxito. Las alteraciones encontradas (en rojo las manchas aumentadas y en azul las disminuidas respecto a los estables) y sus respectivas identificaciones se detallan en este caso en la tabla TR_16. Las 48 manchas identificadas corresponden a 20 proteínas diferentes.

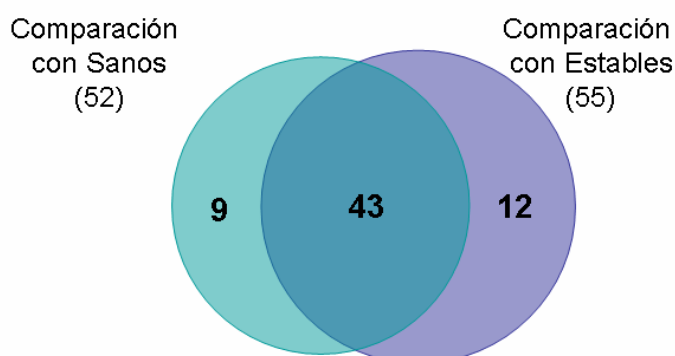


Figura R_30: Diagrama de Venn que ilustra las manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas encontradas en una y otra comparación. 43 de ellas aparecen en las dos comparaciones, mientras que 12 se detectaron exclusivamente en la comparación con los pacientes estables y sólo 9 aparecen únicamente en la comparación con los voluntarios sanos.

Resultados

Nº mancha	E vs T=0	E vs T=4d	E vs T=2m	E vs T=6m	E vs S	Proteína	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
1303	6,59	12,13	3,94	4,83		TPM4	306	27570	4,77	58	P67936
1308	3,36	2,83	3,18			Hemopexin	146	52385	6,55	9	P02790
2002	-1,93	-3,75		-1,87	-2,35						
2307	-2,18	-2,24	-1,94	-4,03	-3,19	Fibrinogen Gamma	117	35497	5,86	22	P02679
2412	-1,70	-2,16	-2,74	-3,54	-3	Fibrinogen Gamma	165	24337	6,49	22	P02679
2512	2,88	2,31				Zinc-alpha-2-glycoprotein	134	34079	5,57	18	P25311
3101	-1,95	-2,86		-3,15	-2,92	Fibrinogen Gamma	112	24337			P02679
3102		-4,00	-2,45	-3,30	-2,87						
3305	-2,49	-2,41	-2,04	-3,52	-2,86	Fibrinogen Gamma	150	46823	5,54	24	P02679
3307	-1,89	-1,67	-1,87	-2,30	-2,42	Fibrinogen Gamma	143	52106	5,37	25	P02679
3506			1,54	1,76	2,66	Apolipoprotein A-IV	118	43358	5,22	19	P06727
3603	-1,63	-1,76	-1,51		-1,31	Complement C3	109	188569	6,02	1	P01024
3706	1,74	2,35				Fibrinogen Gamma	152	35497	5,86	30	P02679
3707		2,06		1,49		Fibrinogen Gamma	162	35497	5,86	35	P02679
4214					-1,43	Apolipoprotein A-I	339	28061	5,27	70	P02647
4215					-1,45	Apolipoprotein A-I	328	28061	5,27	67	P02647
4301	-2,55	-2,82	-2,48	-3,61	-3,11	Fibrinogen Gamma	140	35497	5,86	29	P02679
4308	6,23	7,45	5,18	3,15		Chloride intracellular channel 1	134	26509	4,7	35	O00299
4402	1,61					Apolipoprotein J	101	16267	5,6	17	P10909
4411	-2,32	-2,44	-2,31	-2,11	-3,44						
4604	-2,67	-2,71	-3,48	-4,51	-3,61						
4607	-2,31			-3,05	-2,71	Vitamin D-binding protein	141	54526	5,4	25	P02774
4613	5,02	7,17	5,65	6,51		Beta-Actin	116	42218	5,24	21	P60709
4702		2,31			2,57	Fibrinogen Gamma	114	52106	5,37	6	P02679
5104	-1,46					Transthyretin; TTR	169	4624	8,18	59	P02766
5205	-1,81	-2,05	-1,75	-1,89	-1,58	Fibrinogen Gamma	111	30759	5,56	4	P02647
5301		-2,98	-1,53	-2,52	-3,33	Complex-forming glycoprotein HC (alpha-1-microglobulin)	152	20592	5,84	13	P02760
5302					-1,59	Transthyretin; TTR	108	12671	5,26	33	P02766
5305		-2,22	-2,30			Inter-alpha-trypsin inhibitor	183	103489	6,51	4	Q14624
5401	-3,09	-2,77	-1,62	-2,23	-2,84						
5501	3,80	3,82	3,13	3,71		Beta-Actin	160	39446	5,78	26	P60709
5505	2,93		2,19	1,94	3,3	CD5 antigen-like	188	39603	5,28	44	Q43866
5507	6,32	9,45	5,69	6,06		Apolipoprotein A-IV	179	45371	5,28	15	P06727
6212		2,53	1,89	2,37		Peroxiredoxin-2	115	22049	5,66	29	P32119
6218	-2,69	-2,50	-2,24	-2,08	-2,23	Apolipoprotein A-I	177	30759	5,56	14	P02647
6603	2,68	2,87	1,84			Fibrinogen Gamma	89	35497	5,86	17	P02679
6708	2,40	2,15	2,08			Fibrinogen Gamma	163	35497	5,86	36	P02679
6719			1,85			Fibrinogen Gamma	176	46823	5,54	33	P02679
7201	-1,59	-2,75	-2,17	-2,60	-1,6	Apolipoprotein A-I	94	30759	5,56	4	P02647
7204	-2,69	-4,25	-1,96	-4,24	-3,14	Apolipoprotein A-I	100	23389	5,55	26	P02647
7208		3,31	2,07								
7302	-1,65	-2,30	-1,95	-2,63	-1,81	Vitamin D-binding protein	155	54526	5,4	26	P02774
7404		5,14	4,36	2,94							
7604	2,63		-2,26	-3,03	-2,39	Fibrinogen Beta	167	52759	8,33	24	P02675
7608	-2,18	-1,71	-1,87	-2,04	-1,93	Fibrinogen Beta	266	40167	6,95	38	P02675
7609	-1,82			-2,35	-2,12	Fibrinogen Beta	130	52759	8,33	20	P02675
7812					1,68	Fibrinogen Beta	94	51358	7,95	16	P02675
8003		2,24				Amyloid related serum protein SAA	162	11675	5,89	70	P02735
8302	-1,59			-2,66		Fibrinogen Beta	141	51358	7,95	10	P02675
8303	-2,13			-2,52	-1,95	Fibrinogen Beta	157	28040	8,16	14	P02675
8402	3,57	2,78	1,97	2,01	2,06	Hakata antigen	203	33381	6,2	22	Q75636
8601			2,26	2,08		Pigment epithelium-derived factor	126	46484	5,97	6	P36955
8701	-2,28	-1,86		-1,88	-1,62	Hemopexin	165	52385	6,55	17	P02790
8703		1,39			1,42	Fibrinogen Beta	235	38081	5,84	46	P02675
9702			1,42	1,61		Hemopexin	106	45916	6,62	18	P02790

Tabla TR_16: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación del plasma deplecionado de los pacientes con SCA y el grupo de pacientes estables mediante 2-DE, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el rojo representa aumento, el azul disminución respecto los estables y el blanco indica que no existen

diferencias. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. Mowse Score, puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoelectrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; N° Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; E vs T=0, comparación de los pacientes T=0 frente a los estables; E vs T=4d, comparación de los pacientes T=4d frente a los estables; E vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los estables; E vs T=6m, comparación de los pacientes T=6m frente a los estables; E vs S, comparación de los sanos frente a los pacientes estables.

5.2. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional) mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)

Como ya se ha descrito en apartados anteriores, el empleo de 2D-DIGE para el análisis del plasma deplecionado permite una buena resolución de las manchas proteicas en la región superior de los geles bidimensionales (60-120 kDa), mientras que detecta un menor número de manchas proteicas en la región inferior (<60 kDa). En esta ocasión el análisis halló en conjunto 57 manchas proteicas (49 en la comparación con sanos y 55 en la comparación con estables) con alteraciones de sus niveles de expresión estadísticamente significativas, al comparar estables, sanos y pacientes con SCA (excluyendo el grupo tratado con Atorvastatina).

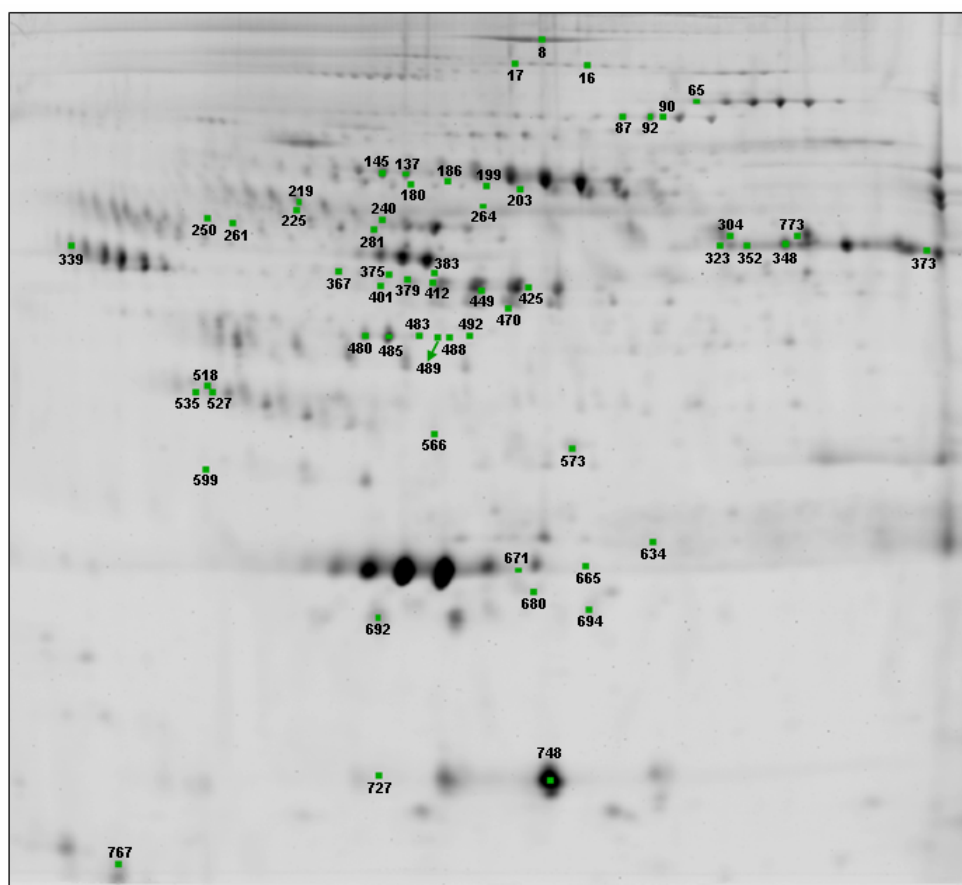


Figura R_31: Imagen representativa de un gel 2D-DIGE sobre el que aparecen señaladas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los pacientes con SCA (que recibieron tratamiento convencional) mediante electroforesis bidimensional convencional 2D-DIGE.

Resultados

La identificación fue posible en 55 de las 57 manchas (que aparecen numeradas en la figura R_31) y sólo en 2 casos falló la identificación.

Nº mancha	S vs T=0	S vs T=4d	S vs T=2m	S vs T=6m	S vs E	Proteína	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
8		1,61				Complement factor H	207	143654	6,23	17	P08603
16		-1,72				Hemopexin	230	45916	6,62	22	P02790
17		-2,78		-2,91		Complement factor H	292	136448	5,98	24	P08603
65		1,92				Complement factor B	150	86847	6,67	7	P00751
87		-1,85	-1,42		-1,44	Gelsolin	127	80578	5,76	12	P06396
90		-1,36		1,35		Alpha-2-macroglobulin	150	86847	6,67	7	P01023
92		-1,91	-1,48		-1,42	Gelsolin	143	86043	5,9	6	P06396
137	1,36					Alpha-1-B-glycoprotein	361	52479	5,65	37	P04217
145				1,38		Alpha-1B-glycoprotein /Hemopexin	393	54809	5,58	33	P04217
180	1,79			2,44		Alpha-1-B-glycoprotein	262	52479	5,65	28	P04217
186		1,43	1,85	2,10	1,62	Hemopexin	128	52385	6,55	4	P02790
199		1,51	2,21	1,97	1,97	Hemopexin	396	52385	6,55	28	P02790
203		1,73				Hemopexin	352	52385	6,55	19	P02790
219	-1,43					Vitronectin	246	55069	5,55	19	P04004
225				-2,03		Vitronectin	100	55069	5,55	12	P04004
261					1,74	Kininogen 1	148	48936	6,29	22	P01042
264					1,79	Beta-2-glycoprotein	202	39584	8,34	22	P02749
281		-1,77				Antithrombin-III	139	53025	6,32	28	P01008
304		-1,86	-1,89	-2,09	-1,72						
323		-1,61				Fibrinogen Gamma	160	46823	5,54	29	P02679
339		1,48	1,41	1,72							
367	1,55					Fibrinogen Gamma	162	35497	5,86	35	P02679
373	1,87	1,99	1,57		1,69	Fibrinogen Beta	518	56577	8,54	40	P02675
375	2,89	2,28	2,19	2,55	1,83	Fibrinogen Gamma	164	35497	5,86	37	P02679
383	1,64					Fibrinogen Gamma	125	52106	5,37	16	P02679
401	1,69	2,09	1,92	1,51	1,76	Fibrinogen Gamma	246	52106	5,37	31	P02679
412	2,35	1,73	2,13	1,74		Fibrinogen Gamma	108	52106	5,37	6	P02679
425		1,82	1,86		1,99	Fibrinogen Beta	447	52106	5,37	44	P02679
449	1,43	1,59	1,51	1,36	1,56	Fibrinogen Gamma	140	52106	5,37	23	P02679
470		1,96	1,70		2,01	Fibrinogen Gamma	161	46823	5,54	27	P02679
480		-1,90				Apolipoprotein A-IV	249	43358	5,22	40	P06727
483					1,62	Apolipoprotein A-IV	412	43358	5,22	56	P06727
485		-2,02			1,71	Apolipoprotein A-IV	400	43358	5,22	61	P06727
488	2,50					Beta-Actin	116	42218	5,24	21	P60709
489	4,54					Beta-Actin	177	40536	5,55	44	P60709
518		-2,28	-2,53	-2,06	-1,71	Apolipoprotein J	132	16267	5,6	17	P10909
527				-1,49		Apolipoprotein J	145	49342	6,27	10	P10909
535	-2,40	-2,51	-2,34	-2,05		Apolipoprotein J	213	53031	5,89	19	P10909
566			-1,92			Inter-alpha-trypsin inhibitor	183	103489	6,51	4	Q14624
573					-3,10	Apolipoprotein E	188	36246	5,65	44	P02649
599	15,5	8,42	6,47	7,7	1,69	TPM4	306	27570	4,77	58	P67936
634		2,14				Serum amyloid P-component	199	25485	6,1	26	P02743
665				-1,76		Apolipoprotein A-I	255	30759	5,56	29	P02647
671			-1,41	-1,55		Apolipoprotein A-I	431	30759	5,56	44	P02647
692		-2,47	-1,74		-2,01	PRO2222 (HRBP)	137	18208	4,89	15	P02753
694		-1,94			-1,65	Tetranectin	204	22921	5,52	27	P05452
727	2,21					Transthyretin	159	15991	5,52	18	P02766
748		-1,68			-1,42	Transthyretin	369	12835	5,33	92	P02766
773				-1,89	-1,56	Hemopexin	132	29068	6,45	18	P02790

Tabla TR_17: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación del plasma deplecionado de los pacientes con SCA y el grupo control sanos mediante 2D-DIGE, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el rojo representa aumento, el azul disminución respecto los sanos y el blanco indica que no existen diferencias. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. Mowse Score, puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoelectrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; S vs T=0, comparación de los pacientes T=0

frente a los sanos; S vs T=4d, comparación de los pacientes T=4d frente a los sanos; S vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los sanos; S vs T=6m, comparación de los pacientes T=6m frente a los sanos; S vs E, comparación de los pacientes estables frente a los sanos.

5.2.1. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de voluntarios sanos.

En esta comparación pudimos detectar diferencias significativas en la expresión de 49 manchas proteicas, de las cuales 47 fueron identificadas y sólo hubo 2 que no pudieron serlo. La tabla TR_17 muestra las diferencias observadas (de nuevo, en azul las manchas proteicas disminuidas y en rojo las aumentadas respecto a los sanos), acompañadas de sus respectivas identificaciones. Las 47 manchas proteicas pertenecían a 23 proteínas distintas.

5.2.2. Comparación de los pacientes con SCA y el grupo control de pacientes estables.

Al realizar la comparación con los pacientes estables, encontramos 55 manchas proteicas con los niveles de expresión significativamente alterados. La mayoría de ellas (47 manchas) correspondían a diferencias detectadas también en la comparación con los sanos, pero de nuevo aparecieron manchas proteicas alteradas en esta comparación (8 manchas) que no aparecían en la anterior, mientras que 2 de las manchas que aparecieron variadas entonces no lo estaban en este caso (figura R_32). La tabla TR_18 recopila las diferencias observadas (en azul se muestran las manchas proteicas disminuidas y en rojo las aumentadas respecto a los estables) y las identificaciones correspondientes, que fueron posibles en 53 de los 55 casos (no pudimos identificar 2 de ellas). Las 53 manchas proteicas pertenecen a 24 proteínas diferentes.

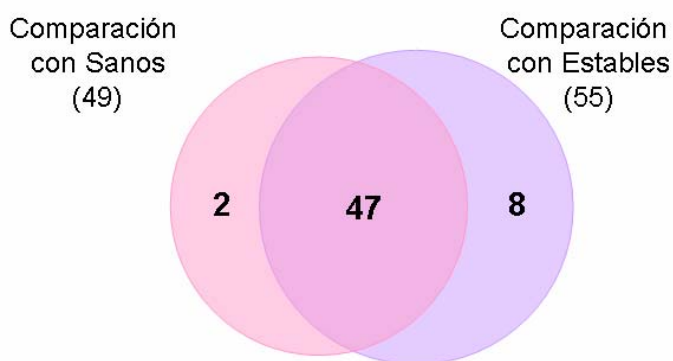


Figura R_32: Diagrama de Venn que ilustra las manchas proteicas con alteraciones estadísticamente significativas encontradas en una y otra comparación. 47 de ellas aparecen en las dos comparaciones, mientras que 8 se detectaron exclusivamente en la comparación con los pacientes estables y sólo 2 aparecen únicamente en la comparación con los voluntarios sanos.

Resultados

Nº mancha	E vs T=0	E vs T=4d	E vs T=2m	E vs T=6m	E vs S	Proteína	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
8	1,49	1,77	1,70			Complement factor H	207	143654	6,23	17	P08603
16	1,78			-3,53		Hemopexin	230	45916	6,62	22	P02790
17	1,42	-1,64		-1,72		Complement factor H	292	136448	5,98	24	P08603
65	2,16	2,90	1,81	2,53		Complement factor B	150	86847	6,67	7	P00751
87	1,67			1,30	1,44	Gelsolin	127	80578	5,76	12	P06396
90		-1,30		1,41		Alpha-2-macroglobulin	82	164600	6	0	P01023
92	2,35	-1,34		1,43	1,42	Gelsolin	143	86043	5,9	6	P06396
145				1,32		Alpha-1B-glycoprotein	393	54809	5,58	33	P04217
180	1,73	1,32		2,35		Alpha-1-B-glycoprotein	262	52479	5,65	28	P04217
186					-1,62	Hemopexin	128	52385	6,55	4	P02790
199	-1,51	-1,31			-1,97	Hemopexin	396	52385	6,55	28	P02790
203	-1,45		1,34			Hemopexin	352	52385	6,55	19	P02790
225	-4,11			-1,84		Vitronectin	100	55069	5,55	12	P04004
240	2,53	1,39	1,63	2,25		Antithrombin-III	138	53025	6,32	11	P01008
250	-2,01	-2,23	-2,30	-1,92		Kininogen 1	319	72996	6,34	14	P01042
261	-1,93	-1,89	-1,98	-1,97	-1,74	Kininogen 1	148	48936	6,29	22	P01042
264	-2,67	-1,66			-1,79	Beta-2-glycoprotein	202	39584	8,34	22	P02749
281		-1,81		-2,36		Antithrombin-III	139	53025	6,32	28	P01008
304					1,72						
323	1,92					Fibrinogen Gamma	160	46823	5,54	29	P02679
339				1,36							
348	2,16	1,30				Fibrinogen Beta	289	56577	8,54	39	P02675
352		1,36	1,58			Fibrinogen Beta	273	56577	8,54	32	P02675
367	1,85					Fibrinogen Gamma	162	35497	5,86	35	P02679
373				-1,32	-1,69	Fibrinogen Beta	518	56577	8,54	40	P02675
375	1,58			1,39	-1,83	Fibrinogen Gamma	164	35497	5,86	37	P02679
379	1,43		1,38			Fibrinogen Gamma	137	52106	5,37	11	P02679
383	1,58					Fibrinogen Gamma	125	52106	5,37	16	P02679
401					-1,76	Fibrinogen Gamma	246	52106	5,37	31	P02679
412	1,43					Fibrinogen Gamma	108	52106	5,37	6	P02679
425				-1,47	-1,99	Fibrinogen Gamma	447	52106	5,37	44	P02679
449					-1,56	Fibrinogen Gamma	140	52106	5,37	23	P02679
470				-1,50	-2,01	Fibrinogen Gamma	161	46823	5,54	27	P02679
480		-2,45	-1,43			Apolipoprotein A-IV	249	43358	5,22	40	P06727
483		-2,19	-1,68		-1,62	Apolipoprotein A-IV	412	43358	5,22	56	P06727
485		-3,45	-1,82		-1,71	Apolipoprotein A-IV	400	43358	5,22	61	P06727
488	4,57	2,64	2,17	2,14		Beta-Actin	116	42218	5,24	21	P60709
489	10,45	3,64	3,44	4,62		Beta-Actin	177	40536	5,55	44	P60709
492	2,25	2,12	1,68	1,59		Apolipoprotein A-IV	179	45371	5,28	15	P06727
518		-1,33	-1,48		1,71	Apolipoprotein J	132	16267	5,6	17	P10909
527	-1,34		-1,67			Apolipoprotein J	145	49342	6,27	10	P10909
535	-1,60	-1,67	-1,56	-1,37		Apolipoprotein J	213	53031	5,89	19	P10909
566	-1,60	-2,46	-1,73	-1,36		Inter-alpha-trypsin inhibitor	183	103489	6,51	4	Q14624
573	4,26	2,20	2,01	2,24	3,10	Apolipoprotein E	188	36246	5,65	44	P02649
599	9,15	4,97	3,82	4,54	-1,69	TPM4	306	27570	4,77	58	P67936
634		1,42		-1,93		Serum amyloid P-component	199	25485	6,1	26	P02743
665	1,90			-1,81		Apolipoprotein A-I	255	30759	5,56	29	P02647
671		-1,34	-1,33	-1,46		Apolipoprotein A-I	431	30759	5,56	44	P02647
680	1,32	2,20				Apolipoprotein A-I	177	30759	5,56	14	P02647
692	2,06			1,49	2,01	PRO2222 (HRBP)	137	18208	4,89	15	P02753
694	1,35		1,47		1,65	Tetranectin	204	22921	5,52	27	P05452
727	2,85	1,39	1,68	1,54		Transthyretin	159	15991	5,52	18	P02766
748					1,42	Transthyretin	162	52385	6,55	16	P02790
767	2,41	2,73	1,69			Vitronectin	121	57688	5,52	5	P04004
773	1,52		1,39		1,56	Hemopexin	132	29068	6,45	18	P02790

Tabla TR_18: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación del plasma deplecionado de los pacientes con SCA y el grupo de pacientes estables mediante 2D-DIGE, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el rojo representa aumento, el azul disminución respecto los estables y el blanco indica que no existen diferencias. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. Mowse Score, puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoeléctrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso,

número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; E vs T=0, comparación de los pacientes T=0 frente a los estables; E vs T=4d, comparación de los pacientes T=4d frente a los estables; E vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los estables; E vs T=6m, comparación de los pacientes T=6m frente a los estables; E vs S, comparación de los sanos frente a los pacientes estables.

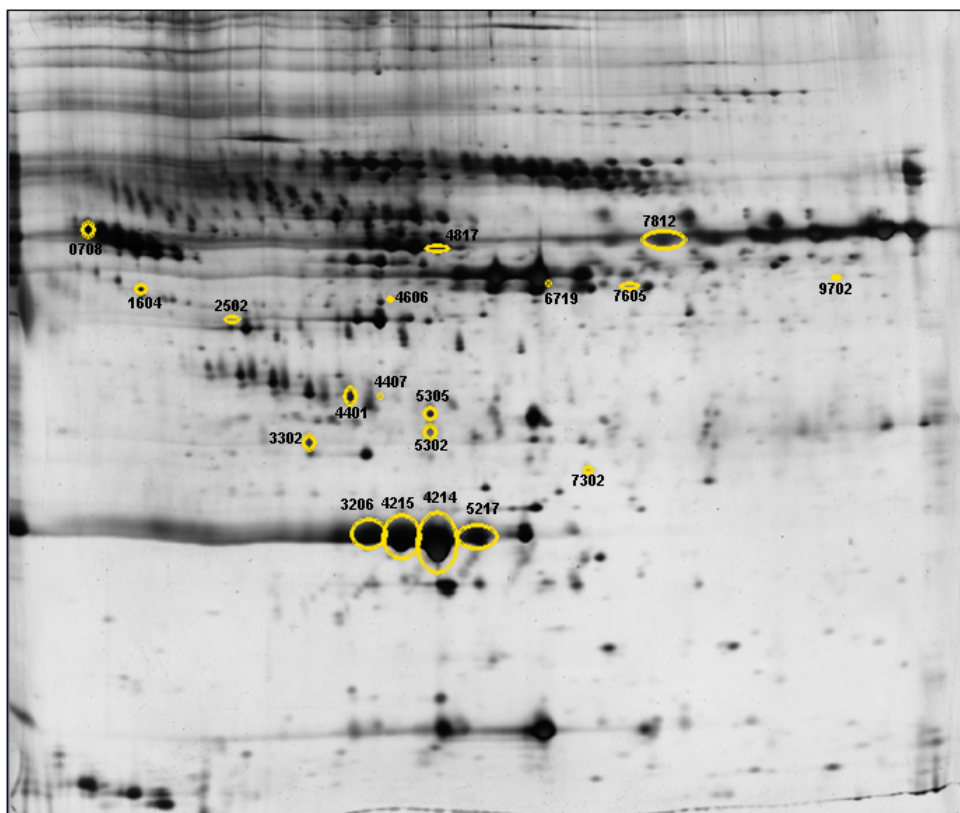


Figura R_33: Imagen representativa de un gel 2-DE sobre el que aparecen señaladas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los pacientes con SCA (tratados o no con Atorvastatina) mediante electroforesis bidimensional convencional 2-DE.

5.3. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina) mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE)

Este análisis, cuyo objetivo era la comparación mediante 2-DE del plasma deplecionado de los pacientes con SCA que habían recibido el tratamiento convencional durante 2 meses, con los que habían recibido el tratamiento con Atorvastatina y los voluntarios sanos, mostró alteraciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión de 19 manchas proteicas (que aparecen numeradas en la figura R_33). De estas 19 manchas pudimos identificar 17, mientras que 2 quedaron sin identificar. La tabla TR_19 recoge las identificaciones junto a las alteraciones detectadas en cada comparación (en rojo las manchas proteicas aumentadas y en azul las disminuidas respecto a los sanos, o respecto a los pacientes T=2m en la última columna). Las 17 manchas proteicas corresponden a 11 proteínas diferentes.

Resultados

Nº mancha	S vs T=2m	S vs T=2m (+ATV)	Proteína	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
708		2,76	Alpha-2-HS-glycoprotein	258	40098	5,43	10	P02765
1604		1,83	Leucine-rich Alpha-2-glycoprotein	166	34553	5,66	30	P02750
2502	3,03	N	Triosephosphate isomerase	145	27095	6,9	36	P60174
3206		-1,75	Apolipoprotein A-I	226	28061	5,27	44	P02647
3302		1,57	AMBp protein	168	39886	5,95	19	P02760
4214	1,33	N	Apolipoprotein A-I	339	28061	5,27	70	P02647
4215	1,42	N	Apolipoprotein A-I	328	28061	5,27	67	P02647
4401		-1,71						
4407		-4,32						
4606		-1,95	Hemopexin	111	52385	6,55	4	P02790
4817	-2,90	N	Vitamin D Binding Protein	361	52780	5,17	47	P02774
5217		-1,39	Apolipoprotein A-I	439	30759	5,56	59	P02647
5302	1,54	2,24	Transthyretin	108	12671	5,26	33	P02766
5305	-2,72	N	Inter-alpha-trypsin inhibitor	183	103489	6,51	4	Q14624
6719	2,19	N	Fibrinogen Gamma	176	46823	5,54	33	P02679
7302		-1,81	Vitamin D-binding protein	155	54526	5,4	26	P02774
7605	1,34	N	Fibrinogen Beta	143	56577	8,54	19	P02675
7812	-2,41	N	Fibrinogen Beta	94	51358	7,95	16	P02675
9702	1,49	N	Hemopexin	106	45916	6,62	18	P02790

Tabla TR_19: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación del plasma deplecionado de los pacientes T=2m y pacientes T=2m(+ATV) y el grupo control sanos mediante 2-DE, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el blanco indica que no existen diferencias, el rojo representa aumento y el azul disminución respecto los sanos. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. N, Normalizado por el tratamiento; Mowse Score, puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoelectrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; S vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los sanos; S vs T=2m(+ATV), comparación de los pacientes T=2m(+ATV) frente a los sanos.

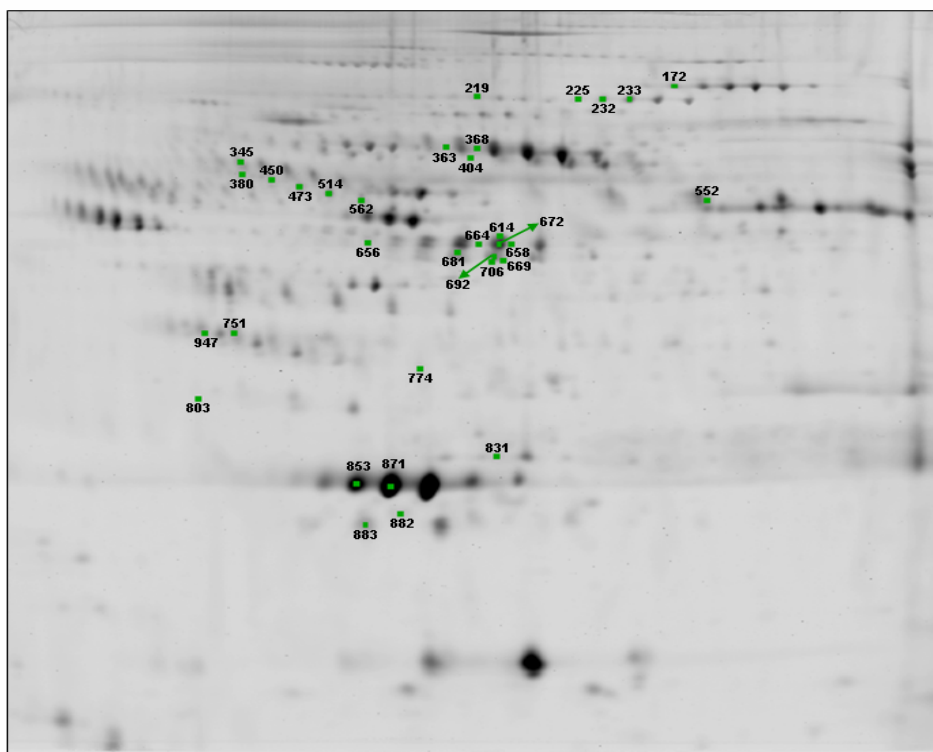


Figura R_34: Imagen representativa de un gel 2D-DIGE sobre el que aparecen señaladas y numeradas las manchas proteicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los pacientes con SCA (tratados o no con Atorvastatina) mediante electroforesis bidimensional convencional 2D-DIGE.

5.4. Análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina) mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)

Al realizar el experimento anterior mediante 2D-DIGE, encontramos 33 manchas proteicas cuyos niveles de expresión mostraban diferencias estadísticamente significativas (que aparecen numeradas en la figura R_34).

Nº mancha	S vs T=2m	S vs T=2m (+ATV)	Proteína	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)	Nº Acceso
172	2,18	N	Complement factor B	150	86847	6,67	7	P00751
219	-1,79	N	Complement C1r	218	81687	5,89	14	P00736
225		-2,52	Complement C1r	106	81661	5,89	12	P00736
232	-1,60	-2,32	Gelsolin	143	86043	5,9	6	P06396
233	-1,61	-1,78	Gelsolin	143	86043	5,9	6	P06396
345	-1,65	N	Kininogen 1	133	72996	6,34	6	P01042
363	2,02	N	Hemopexin	184	52385	6,55	17	P02790
368	1,95	N	Hemopexin	573	52385	6,55	25	P02790
380	-1,54	N	Vitronectin	206	46895	5,52	22	P04004
404	2,38	N	Hemopexin	396	52385	6,55	28	P02790
450	-1,57	N	Angiotensinogen	164	53438	5,87	13	P01019
473	-1,58	N	Angiotensinogen	381	53406	5,87	13	P01019
514	-1,55	N	Angiotensinogen	370	53406	5,87	22	P01019
552	-1,75	N						
562		-1,7	Angiotensinogen	264	53406	5,87	20	P01019
614	1,60	2,23	Fibrinogen Gamma	557	52106	5,37	52	P02679
656	1,64	1,9	Fibrinogen Gamma	246	52106	5,37	31	P02679
658	1,60	1,99	Fibrinogen Gamma	447	52106	5,37	44	P02679
664	2,35	1,91	Fibrinogen Gamma	349	52106	5,37	45	P02679
672	1,67	2,48	Fibrinogen Gamma	253	47971	5,54	44	P02679
681	1,62	1,97	Fibrinogen Gamma	181	46823	5,54	35	P02679
692	1,89	2,81	Fibrinogen Gamma	510	52106	5,37	51	P02679
699	1,54	2,33	Fibrinogen Gamma	447	52106	5,37	44	P02679
706	1,65	2,8	Fibrinogen Gamma	161	46823	5,54	27	P02679
751	-1,76	N	Apolipoprotein J	202	49342	6,27	15	P10909
774	-2,00	N	Inter-alpha-trypsin inhibitor	183	103489	6,51	4	Q14624
803	2,50	N	TPM4	306	27570	4,77	58	P67936
831		2,64	Serum amyloid P-component	129	23358	6,12	34	P02743
853		-2,66	Apolipoprotein A-I	226	28061	5,27	44	P02647
871	-1,96	-3,26	Apolipoprotein A-I	328	28061	5,27	67	P02647
882	-3,53	-7,43	Tetranectin	147	22921	5,52	20	P05452
883	-1,97	-4,4	PRO2222 (HRBP)	137	18208	4,89	15	P02753
947	-2,25	-1,91	Apolipoprotein J	145	49342	6,27	10	P10909

Tabla TR_20: Lista de manchas proteicas alteradas en la comparación del plasma deplecionado de los pacientes T=2m y pacientes T=2m(+ATV) y el grupo control sanos mediante 2D-DIGE, incluyendo las correspondientes identificaciones. En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha. A continuación, las columnas correspondientes a cada comparación, con un código de colores: el blanco indica que no existen diferencias, el rojo representa aumento y el azul disminución respecto los sanos. En las casillas rojas y azules aparece además el correspondiente cociente de variación. N, Normalizado por el tratamiento; Mowse Score, puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT; MM (Da), Masa molecular (en Dalton); pI, punto isoeléctrico; C.S. (%), porcentaje de cobertura de secuencia; Nº Acceso, número asignado por la base de datos SwissProt a cada proteína; S vs T=2m, comparación de los pacientes T=2m frente a los sanos; S vs T=2m(+ATV), comparación de los pacientes T=2m(+ATV) frente a los sanos; T=2m vs T=2m(+ATV).

La identificación fue posible en 32 de las 33 manchas, quedando sólo 1 sin identificar. Las alteraciones detectadas en cada comparación (en azul las manchas proteicas disminuidas y en rojo las aumentadas respecto al grupo de individuos sanos, o

Resultados

respecto a los pacientes no tratados con Atorvastatina en el caso de la última columna) y sus respectivas identificaciones aparecen resumidas en la tabla TR_20. Las 32 manchas proteicas corresponden a 15 proteínas diferentes.

5.5. Clasificación funcional de las proteínas identificadas

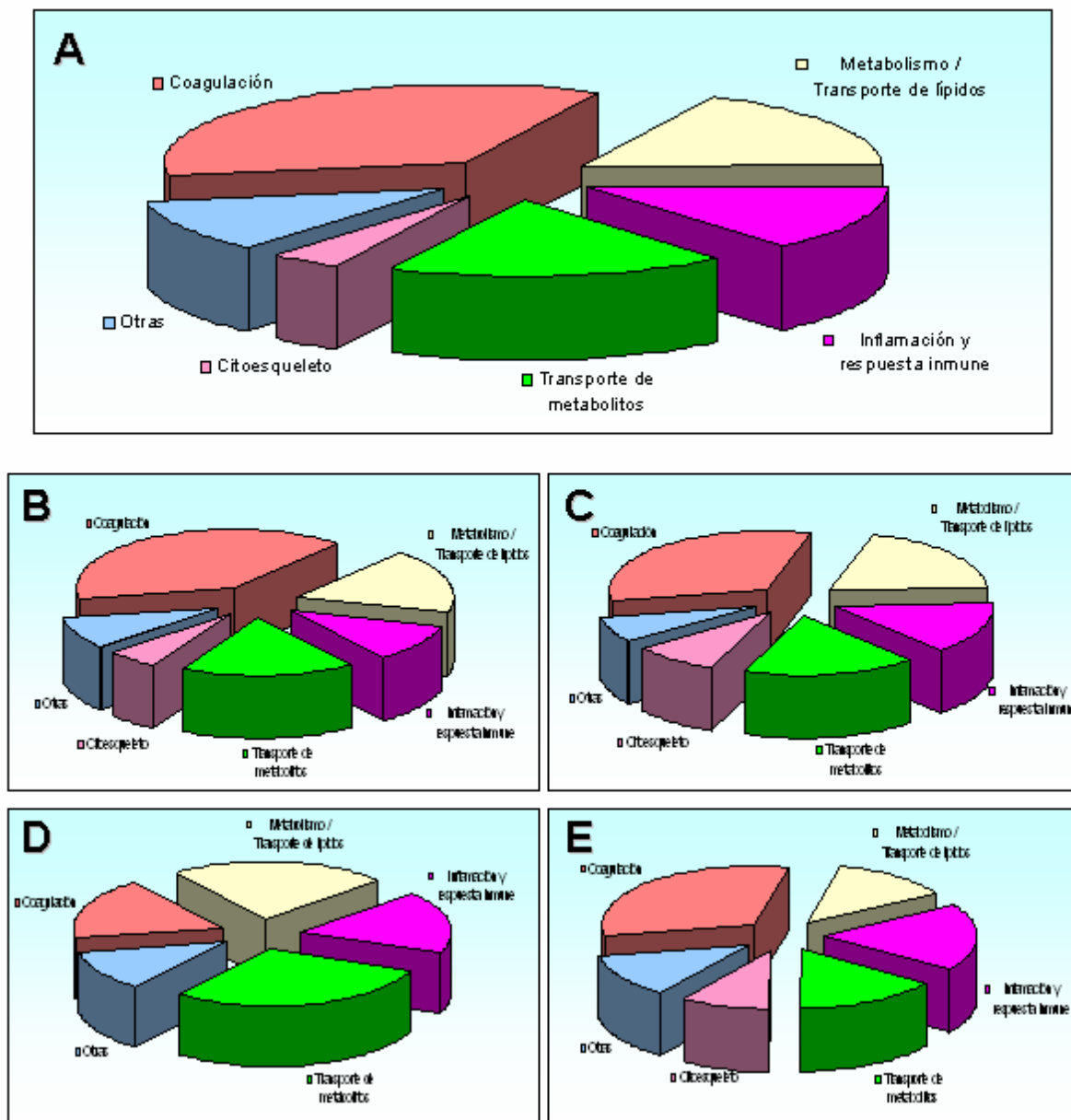


Figura R_35: Clasificación de proteínas por su funcionalidad. (A) El gráfico muestra la distribución de las 124 manchas proteicas identificadas en el conjunto de los análisis realizados (que corresponden a 39 proteínas) en 6 grupos funcionales: Coagulación, Metabolismo/Transporte de lípidos, Inflamación y respuesta inmune, Transporte de metabolitos, Citoesqueleto y Otras funciones (que incluye aquellas proteínas cuya función no pertenecía a ninguno de los grupos anteriores). La misma clasificación se realizó con: (B) las 56 manchas proteicas (que corresponden a 22 proteínas) identificadas en el análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional) mediante 2-DE; (C) las 55 manchas proteicas (que corresponden a 24 proteínas) identificadas en el análisis de pacientes con SCA (tratamiento convencional) mediante 2D-DIGE; (D) las 17 manchas proteicas (que corresponden a 11 proteínas) identificadas en el análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina) mediante 2-DE; (E) las 32 manchas proteicas (que corresponden a 15 proteínas) identificadas en el análisis de pacientes con SCA (tratamiento con Atorvastatina) mediante 2D-DIGE.

Tomando en conjunto los datos generados en los apartados anteriores, conseguimos identificar con éxito un total de 125 manchas proteicas, que corresponden a 39 proteínas diferentes. Estas 39 proteínas se clasificaron según su función en 6 categorías funcionales (figura R_35):

- Proteínas de la coagulación: Antitrombina-III, β -2-Glicoproteína, Fibrinógeno Beta, Fibrinógeno Gamma y Kininógeno 1.
- Metabolismo / Transporte de lípidos: Apolipoproteína A-I (ApoA-I), Apolipoproteína A-IV (ApoA-IV), Apolipoproteína E (ApoE), Apolipoproteína J (ApoJ) y Zinc- α -2-Glicoproteína.
- Inflamación y respuesta inmune: α -2-HS-Glicoproteína, Proteína precursora de la α 1-Microglobulina y Bikunina (AMBP), Proteína Amiloide A del suero (SAA), Antígeno similar a CD5, Complemento C1r, Complemento C3, Complemento factor B, Complemento factor H, Complejo Glicoproteína-HC (o α 1-Microglobulina), Inhibidor de Inter- α -Tripsina (o Bikunina), Componente P Amiloide del Suero (SAP) y Vitronectina.
- Transporte de metabolitos: Hemopexina, Proteína de unión a Retinol Humana (HRBP), Tetranectina, Transtiretina y Proteína de unión a Vitamina D (VDBP).
- Citoesqueleto: β -Actina, Gelsolina y Tropomiosina 4 (TPM4).
- Otras funciones: α -1-B-Glicoproteína, α -2-Macroglobulina, Angiotensinógeno, Canal intracelular de Cloro 1, Antígeno Hakata, α -2-Glicoproteína rica en Leucina, Peroxiredoxina-2, Triosafosfato Isomerasa, Factor derivado del Pigmento de Epitelio (PEDF).

Las 39 proteínas y sus correspondientes funciones aparecen resumidas en las tablas TR_21-26.

Proteína	Función
Antithrombin-III	Inhibidor de serín-proteasas más importante del plasma que regula la cascada de la coagulación (inhibe la trombina).
Beta-2-glycoprotein	Capaz de unirse a sustancias cargadas negativamente. Puede prevenir la activación de la cascada de coagulación uniéndose a los fosfolípidos de la superficie de las células dañadas.
Fibrinogen Beta	El fibrinógeno tiene una doble función en la coagulación: al romperse genera monómeros que polimerizan en fibrina y actúa como cofactor en la agregación plaquetaria.
Fibrinogen Gamma	El fibrinógeno tiene una doble función en la coagulación: al romperse genera monómeros que polimerizan en fibrina y actúa como cofactor en la agregación plaquetaria.
Kininogen 1	Los kininógenos son inhibidores de tiol-proteasas y participan en la coagulación inhibiendo la agregación de plaquetas inducida por trombina y plasmina.

Tabla TR_21: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Proteínas de la coagulación”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Resultados

Proteína	Función
Apolipoprotein A-I	Participa en el transporte reverso del colesterol de los tejidos al hígado. Lipoproteína del complejo HDL. Cofactor de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa).
Apolipoprotein A-IV	Componente principal del complejo HDL y los quilomicrones. Podría participar en el catabolismo de quilomicrones y VLDL. Activador de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa).
Apolipoprotein E	Media la unión, internalización y catabolismo de lipoproteínas. Puede servir de ligando para el receptor de LDL (apoB/E) y para el receptor específico de Apo E en los tejidos hepáticos.
Apolipoprotein J	No está clara. Parece ser capaz de unirse a membranas y proteínas hidrofóbicas. Se le ha relacionado con la apoptosis.
Zinc-alpha-2-glycoprotein	Estimula la degradación de los lípidos en los adipocitos. Podría unirse a ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla TR_22: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Metabolismo / Transporte de lípidos”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Alpha-2-HS-glycoprotein	Promueve la endocitosis. Posee propiedades de opsonización.
AMBP protein	Formada por: Complex-forming glycoprotein HC (Podría estar relacionada con la respuesta inmune) + Inter-alpha-trypsin inhibitor (Podría estar implicada en las reacciones de fase aguda).
Amyloid related serum protein SAA	Reactivo fundamental de la fase aguda. Apolipoproteína del complejo HDL.
CD5 antigen-like	Puede participar en la regulación del sistema inmune. Parece jugar un papel en la inhibición de la apoptosis.
Complement C1r	Serín-proteasa que se combina con C1q y C1s para formar C1 (ruta clásica del complemento).
Complement C3	Activación del sistema del complemento.
Complement factor B	Forma parte de la ruta alternativa del complemento.
Complement factor H	Forma parte de la ruta alternativa del complemento.
Complex-forming glycoprotein HC	Inhibidor de la tripsina, plasmina y elastasa lisosomal granulocítica. Podría estar relacionada con la respuesta inmune.
Inter-alpha-trypsin inhibitor	Podría estar implicada en las reacciones de fase aguda.
Serum Amyloid P-component	Puede interaccionar con ADN e histonas y puede retirar el material nuclear liberado por células circulantes dañadas. Puede funcionar como una lectina dependiente de calcio. (Fase aguda)
Vitronectin	Molécula de adhesión celular. Inhibe el daño celular mediado por el complemento.

Tabla TR_23: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Inflamación y respuesta inmune”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Hemopexin	Se une al grupo hemo y lo transporta al hígado para su degradación y recuperación de hierro, después de lo cual la hemopexina libre vuelve a la circulación.
PRO2222 (HRBP)	Reparte retinol de las reservas del hígado a tejidos periféricos. En el plasma los complejos RBP-retinol interaccionan con transtiretina, evitando su pérdida por filtración glomerular en el riñón.
Tetranectin	Se une al plasminógeno. Puede estar involucrada en el empaquetamiento de moléculas para la exocitosis.
Transthyretin	Proteína de unión a la hormona tiroidea. Probablemente transporta la tiroxina del torrente sanguíneo al cerebro.
Vitamin D Binding Protein	Proteína multifuncional de los fluidos biológicos. Transporta la vitamina D y evita la polimerización de monómeros de actina.

Tabla TR_24: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Transporte de metabolitos”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Beta-Actin	Las actinas son proteínas altamente conservadas implicadas en motilidad celular. Transporte de ATP.
Gelsolin	Proteína regulada por calcio y moduladora de actina que se une a los filamentos de actina bloqueando los extremos.
TPM4	Se une a los filamentos de actina. Juega un papel central, en asociación con el complejo de troponina, en la regulación de la contracción del músculo estriado de los vertebrados.

Tabla TR_25: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Citoesqueleto”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

Proteína	Función
Alpha-1-B-glycoprotein	Función desconocida
Alpha-2-macroglobulin	Capaz de inhibir las cuatro clases de proteasas mediante un mecanismo de "trampa"
Angiotensinogen	Interviene en la regulación de la presión sanguínea.
Chloride intracellular channel 1	Canal de iones cloruro.
Hakata antigen	Involucrada en el ejercicio de la actividad lectina del suero.
Leucine-rich Alpha-2-glycoprotein	Función desconocida
Peroxioredoxin-2	Involucrada en la regulación redox de la célula. Puede participar en la cascada de regulación del TNF-alfa.
Pigment epithelium-derived factor	Proteína neurotrófica. Potente inhibidor de la angiogénesis. No tiene actividad inhibidora de serín-proteasa.
Triosephosphate Isomerase	Actividad triosafosfato-isomerasa (metabolismo de carbohidratos).

Tabla TR_26: Lista de las proteínas agrupadas en la categoría “Otras funciones”. Junto a cada proteína aparece una breve descripción de su función específica.

6. Validación de los resultados mediante inmunodetección

Para tratar de confirmar algunos de los datos obtenidos tras análisis mediante electroforesis bidimensional (2-DE y 2D-DIGE) del plasma deplecionado de pacientes con SCA, se utilizó la técnica de inmunodetección (o Western Blot). Aplicando este método pretendíamos corroborar las diferencias detectadas en los niveles de expresión de algunas de las proteínas identificadas, empleando para ello anticuerpos específicos (figura R_36). Para comprobar las diferencias en la expresión de la proteína Tropomiosina 4 (TPM4) se realizó un experimento de inmunodetección en gel de una dimensión, en el que aparece una banda inmunorreactiva de 32 kDa correspondiente al tamaño observado en nuestros geles para esta proteína (figura R_36A). Dicha banda se observaba en los pacientes T=4d, pero apenas era visible en los sanos. Lo mismo se apreciaba en la inmunodetección bidimensional, lo que corroboraba los datos obtenidos en el análisis proteómico.

Resultados

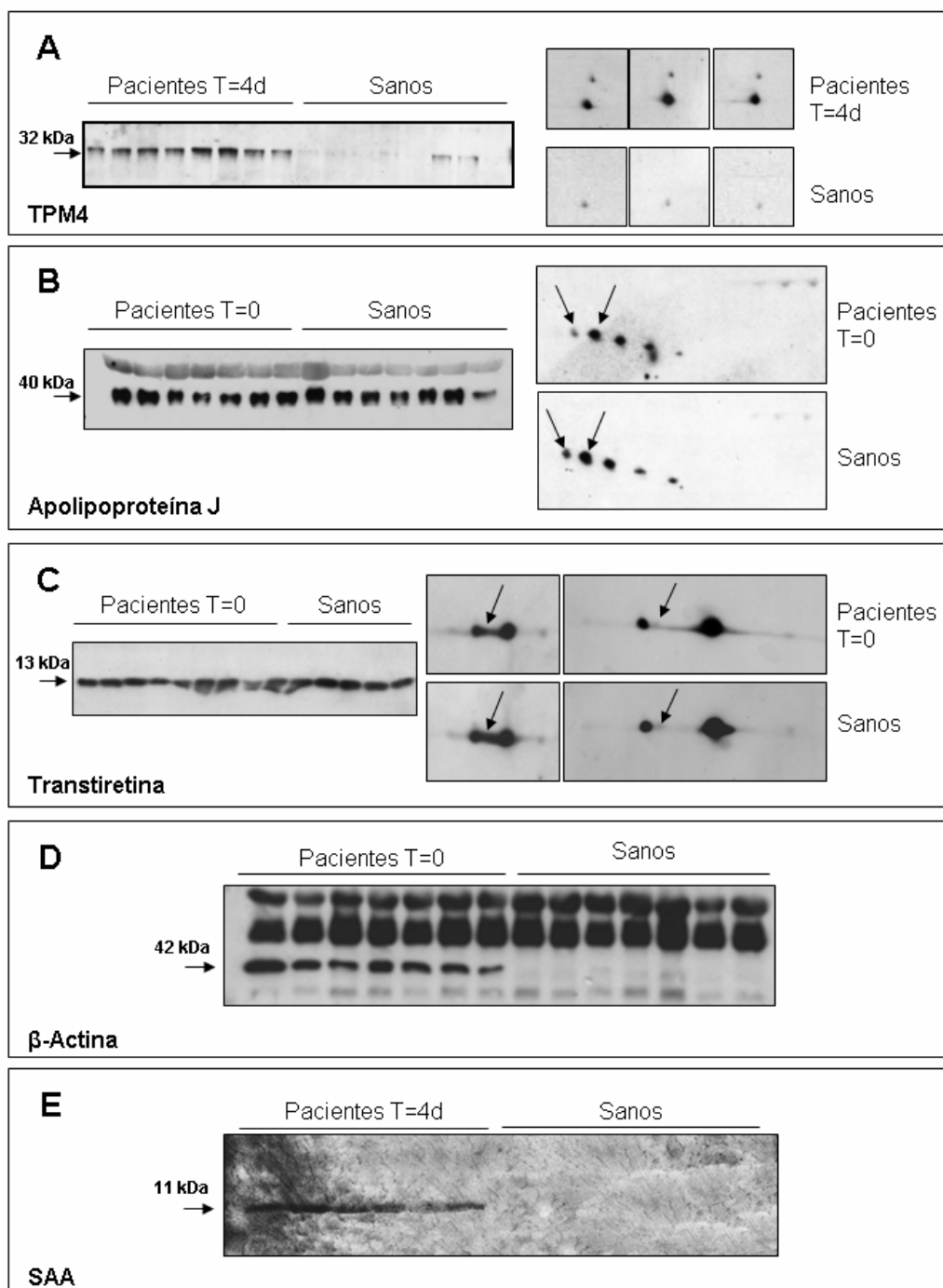


Figura R_36: Resultados de las inmunodetecciones realizadas para confirmar los resultados del análisis proteómico. **(A)** Tropomiosina 4 (TPM4): La inmunodetección en gel de una dimensión muestra una banda inmunorreactiva de 32 kDa en los pacientes T=4d que no se observa en los sanos (izquierda), lo que se confirma en la inmunodetección bidimensional (derecha). **(B)** Apolipoproteína J: se observa una banda inmunorreactiva de 40 kDa en la inmunodetección en gel de una dimensión, que no obstante no muestra diferencias de expresión entre sanos y pacientes T=0 (izquierda). Sin embargo, la inmunodetección bidimensional muestra una menor expresión de las dos isoformas más **ácidas** en los pacientes T=0 respecto a los sanos (derecha). **(C)** Transtiretina: Al igual que en el caso de la Apolipoproteína J, la inmunodetección en gel de una dimensión no muestra diferencias (izquierda). Sin embargo sí se aprecia una expresión menor en los pacientes T=0 respecto a los sanos en la inmunodetección bidimensional en tiras IPG de 7cm (centro) y en tiras IPG de 18cm (derecha). **(D)** β -Actina: Se aprecia una banda inmunorreactiva de 42 kDa en los pacientes T=0 que prácticamente no aparece en los sanos en la inmunodetección en gel de una dimensión. **(E)** Proteína Amiloide A del suero (SAA). Como en el caso de la TPM 4, la inmunodetección en gel de una dimensión muestra una banda inmunorreactiva de 11 kDa en los pacientes T=4d que no se observa en los sanos.

En cambio, en la inmunodetección en gel de una dimensión de la Apolipoproteína J (ApoJ), aparecía una banda de 40 kDa (figura R_36B) que coincidía con el tamaño observado para esta proteína en nuestros geles, pero no mostraba ninguna diferencia entre sanos y pacientes T=0. Sin embargo, al realizar el experimento de inmunodetección bidimensional, sí se apreciaba una disminución de las dos isoformas con pI más ácido (izquierda), lo que de nuevo confirmaba los resultados del análisis proteómico. Un resultado similar se obtuvo en los experimentos de inmunodetección de la Transtiretina (figura R_36C), donde no se apreciaron diferencias entre sanos y pacientes T=0 en el experimento unidimensional pero sí en los bidimensionales (tanto con tiras IPG de 7 cm, como con tiras de 18 cm). En el caso de la β -Actina (figura R_36D), la inmunodetección en gel unidimensional fue suficiente para comprobar que la banda inmunorreactiva de 42 kDa correspondiente a esta proteína se observaba claramente en los pacientes T=0, mientras que apenas se apreciaba en los sanos. Lo mismo ocurría con la Proteína Amiloide A del suero (SAA), cuya banda inmunorreactiva de 11 kDa (figura R_36E) se observaba claramente en los pacientes T=4d, mientras que no aparecía en los sanos, lo cual coincidía de nuevo con los resultados obtenidos mediante el análisis proteómico del plasma deplecionado.

Discusión

Lo que nos crea problemas no es lo que no sabemos,
es lo que sabemos con certeza y no es así.

Mark Twain

A pesar de que el estudio de los mecanismos que llevan a la trombosis de la placa ha sido uno de los temas clave en la investigación cardiovascular de los últimos tiempos, aún se desconoce gran parte de la fisiopatología de la aterotrombosis. Este desconocimiento se debe fundamentalmente a la complejidad de los mecanismos de trombosis de la placa de ateroma, que no forman una simple cadena de acontecimientos, sino que constituyen un entramado de moléculas con múltiples relaciones entre sí, difícil de esclarecer. Por ello, una estrategia de gran interés, que proporcionaría nuevos datos sobre su patogenia, era el estudio a nivel global de las proteínas involucradas en el proceso aterotrombótico. En la actualidad es posible realizar este tipo de abordajes mediante la tecnología proteómica. De hecho, el estudio del proteoma es, probablemente, el sistema experimental más adecuado para conocer células y tejidos, puesto que analiza directamente el producto final del genoma. En los últimos años se ha producido un fuerte avance en la proteómica, pudiendo estudiar la expresión de proteínas a gran escala empleando diferentes técnicas de separación (electroforesis bidimensional, cromatografía multidimensional) [79, 90, 151, 155, 211-214] e identificación de proteínas (espectrometría de masas) en combinación con herramientas bioinformáticas [159, 215]. En nuestro laboratorio consideramos que el empleo de esta metodología en el estudio global de las proteínas implicadas en la aterotrombosis es una interesante estrategia que permitiría avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en este proceso. Puesto que la sangre humana es una muestra sencilla de obtener, que puede además proporcionar información muy valiosa desde el punto de vista clínico, pensábamos que el análisis proteómico de los elementos de la sangre de los pacientes con SCA podría utilizarse como una herramienta para la

identificación y validación de biomarcadores diagnósticos y terapéuticos [49]. Para ello, había que estudiar por un lado las células sanguíneas, en especial aquellas más directamente implicadas en el proceso aterogénico como los macrófagos y monocitos circulantes y, por otro lado, las proteínas que circulan en el plasma. Además, nos interesaba analizar el efecto del tratamiento intensivo con estatinas en los pacientes, ya que desde la publicación del estudio “4S” [42-44], una serie de ensayos han establecido los beneficios del tratamiento y prevención de los eventos cardiovasculares mediante el tratamiento intensivo con estatinas [45, 47, 48]. Sin embargo, aunque se sabe que los beneficios clínicos del tratamiento con estatinas implican efectos de modulación en la disfunción endotelial, estrés oxidativo, inflamación, respuesta inmune, proliferación, apoptosis y trombosis [216], los mecanismos que explican los beneficios del tratamiento con dosis elevadas de estatinas no han podido ser esclarecidos por completo. De nuevo, consideramos que un abordaje proteómico podría aportarnos nueva información sobre los efectos de este tratamiento.

Con estas premisas, se diseñó un estudio en el cual se recogería sangre de pacientes con SCA en el momento de su ingreso en urgencias, a los 4 días, 2 meses y 6 meses después del episodio agudo, para aislar los componentes de esa sangre y compararlos por separado con los de un grupo control de voluntarios sanos y otro de pacientes estables. De este modo, se establecieron los objetivos de la presente tesis doctoral, en la que hemos analizado por separado el proteoma de los monocitos circulantes y el plasma de estos pacientes.

A) MONOCITOS

Los monocitos y macrófagos juegan un papel central en la formación y complicación de la placa de ateroma, por lo que han sido foco de atención de diversas investigaciones. A pesar de ello, aún no llegamos a comprender la totalidad de sus funciones en la aterotrombosis. Por este motivo, hemos realizado un estudio proteómico de los monocitos circulantes en pacientes con SCA. Uno de los objetivos era identificar nuevas proteínas implicadas en el desarrollo del SCA, que pudiesen ser la base de futuros estudios para averiguar en qué parte del proceso aterorombótico están implicadas. Además, estas proteínas expresadas diferencialmente durante la enfermedad podrían ser nuevos candidatos para ser probados en ensayos clínicos como biomarcadores pronósticos [49]. Por ello, elegimos para este estudio pacientes con SCA

sin elevación del segmento ST, ya que en estas condiciones la necrosis del miocardio es mínima (o incluso inexistente). En el resto de los subtipos de SCA en los que tiene lugar una elevación del segmento ST se produce una importante necrosis que induce cambios inflamatorios sistémicos. En este caso, las alteraciones observadas en el proteoma de los monocitos podrían ser una consecuencia de la necrosis del miocardio, en lugar de estar potencialmente relacionadas con la fisiopatología del SCA.

Los mapas proteicos de los monocitos circulantes de los pacientes incluidos en el estudio mostraron 25 manchas con los niveles de expresión alterados en los pacientes con SCA respecto a los voluntarios sanos, 20 de las cuales estaban también alteradas en la comparación con los pacientes estables. Algunas de las manchas son isoformas potenciales, probablemente originadas por modificaciones postraduccionales, de modo que tenemos en realidad 20 proteínas al comparar con los sanos, mientras que si comparamos con los pacientes estables son 17 las proteínas cuya expresión se ve alterada durante el SCA. En ambos casos el número de alteraciones fue máximo en el momento del ingreso y fue decreciendo progresivamente. Seis meses después del SCA, el proteoma de los monocitos circulantes se estabilizó, asemejándose mucho al de los pacientes estables. Ambos grupos mostraban diferencias en 5 proteínas respecto al grupo control sanos [66].

Por otro lado, hemos tratado de estudiar el efecto del tratamiento intensivo con estatinas en el proteoma de los monocitos circulantes ya que, aunque está demostrada su eficacia en el tratamiento y prevención de la enfermedad coronaria y otras formas de aterosclerosis [42-44], los mecanismos que explican estos beneficios aún no han podido ser explicados.

El estudio de los mapas bidimensionales de los monocitos circulantes de pacientes tratados y no tratados con Atorvastatina puso de manifiesto que el tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d durante los dos meses siguientes al SCA modificaba la expresión de 27 manchas proteicas respecto al tratamiento convencional. Estas 27 manchas proteicas corresponden a 20 proteínas diferentes [217].

Las proteínas identificadas, de las cuales se comentarán a continuación las más interesantes, se agruparon según sus funciones en seis categorías diferentes.

Proteínas energéticas y del metabolismo

La Triosafosfato isomerasa, la Proteína de unión el receptor Manosa-6-fosfato, la Proteína Disulfuro-isomerasa ER60 (PDI) y las Piruvato-quinasas son proteínas mitocondriales. La mitocondria proporciona la energía para el mantenimiento y reparación de los componentes celulares. Se piensa que el deterioro de las funciones mitocondriales juega un papel principal en muchas enfermedades provocadas por los daños causados por las especies reactivas del oxígeno [218]. El estrés oxidativo mitocondrial ha sido implicado en la enfermedad cardiaca, incluyendo la isquemia y otras patologías. A excepción de la Triosafosfato isomerasa, cuya expresión se ve disminuida de un modo similar en los pacientes con SCA y los pacientes estables, las proteínas de este grupo estaban infraexpresadas específicamente en los pacientes con SCA respecto a los sanos y no en los estables. Por tanto, una disminución en la expresión de estas proteínas podría estar relacionada con el inicio del SCA. La posibilidad de que estos cambios sean secundarios al SCA o bien que estén directamente implicados en la fisiopatología de la enfermedad debe ser objeto de futuros trabajos.

La PDI es una proteína multifuncional que cataliza la oxidación, reducción e isomerización de los puentes disulfuro dentro de una molécula durante el procesamiento postraducciona [219]. Juega un papel crucial en la respuesta inmune e inflamatoria y su sobreexpresión puede suprimir la actividad transcripcional dependiente de NF- κ B [220]. Por su parte la expresión de NF- κ B, que induce la expresión de muchas proteínas proinflamatorias y protrombóticas [221], está elevada en las placas ateroscleróticas responsables del SCA [222] y en las células mononucleares de sangre periférica durante el evento [223]. En nuestro estudio, los monocitos de los pacientes T=0 mostraron un descenso significativo de una isoforma de la PDI y la ausencia absoluta de otra que no ocurría en los pacientes estables. Además, esta última isoforma permanecía ausente durante al menos dos meses. Esto nos indica que, en el SCA, el aumento de actividad NF- κ B podría deberse a una ausencia de regulación negativa por parte de la PDI. Más aún, pudimos observar que el tratamiento con Atorvastatina normalizaba la expresión de la isoforma ausente de la PDI en los pacientes T=2m. Esto concuerda con trabajos recientes que muestran una reducción de la actividad de NF κ B causada por un tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d, tanto en la placa de ateroma como en las células mononucleares de sangre periférica [224]. Por tanto, la normalización de la expresión de

la PDI provocada por la terapia con Atorvastatina podría mediar esta reducción de la actividad de NFκB.

La ruta glicolítica estaba elevada en los pacientes T=0, habiendo un aumento en la expresión de la proteína α-Enolasa que se normalizaba a los 4 días y no existía en los pacientes estables. Estos resultados sugieren un balance a favor de esta ruta en detrimento de la oxidación de los ácidos grasos. Se ha visto que la expresión de esta enzima aumenta en los macrófagos peritoneales de ratón cuando se transforman en células espumosas a través de la acumulación de ésteres del colesterol [225]. Por tanto, durante el SCA los monocitos circulantes muestran características bioquímicas que los predisponen a convertirse en células espumosas una vez que se internen en la pared vascular.

Las Glutation-transferasas tienen una función protectora, modulando el estrés oxidativo. La trasfección con el ADNc de la Glutation S-transferasa A4-4 protege las células endoteliales de la apoptosis inducida por peróxidos [226], un proceso biológico relacionado con la inestabilidad de la placa de ateroma [227, 228]. Además, la inducción de esta y otras enzimas antioxidantes en células musculares lisas de rata aumenta su resistencia al daño vascular oxidativo [229]. La Glutation-transferasa también está implicada en la detoxificación de sustancias dañinas procedentes del tabaco, como los epóxidos. La carencia genética de Glutation S-transferasa predice un aumento en la incidencia de infarto cerebral y de miocardio en fumadores diabéticos [230]. La ausencia de expresión de esta enzima en los monocitos en el SCA apunta a una reducción en la capacidad antioxidante del organismo como detonante de este síndrome, ya que su expresión era normal en los pacientes estables.

En cuanto al tratamiento con Atorvastatina, pudimos observar que los niveles de expresión de la Piruvato-quinasa y la Triosafosfato isomerasa, que estaban ausente y disminuida respectivamente en los pacientes T=2m, se normalizaban en los pacientes tratados con Atorvastatina. Por otro lado, la Fosfoglicerato-quinasa, que estaba aumentada en los pacientes que recibieron el tratamiento convencional respecto a los sanos, era parcialmente normalizada en los pacientes T=2m(+ATV). En un estudio realizado en monos, se observó que la Triosafosfato isomerasa presenta unos niveles de expresión disminuidos en el ventrículo izquierdo de machos viejos, comparados con hembras o machos jóvenes, lo que sugiere que este descenso podría tener relación con el aumento en la incidencia de eventos cardiovasculares en los monos de mayor edad

[231]. El aumento en la expresión de esta enzima causado por el tratamiento con Atorvastatina sugiere un papel protector para esta terapia. La ATP-sintasa, una enzima implicada en la producción de energía, estaba disminuida en los pacientes T=2m y el tratamiento con Atorvastatina la normalizaba. En cualquier caso, no existen datos previos sobre los posibles efectos de las estatinas en la expresión de estas proteínas, por lo que serán necesarios futuros estudios para explicar su posible papel en este escenario.

Enzimas hidrolíticas

La Catepsina D es una proteasa responsable de la degradación de proteínas intracelulares y también endocitadas [232]. Se sintetiza como un precursor (Catepsina D proforma) que se activa mediante proteólisis dando lugar a la forma madura en diferentes compartimentos celulares. La forma madura podría modificar el LDL, lo que induce la formación de las células espumosas [233]. Además, se ha sugerido que la Catepsina D podría participar en la apoptosis de los macrófagos, favoreciendo la inestabilidad de la placa [234]. Los pacientes con SCA mostraron una ausencia de expresión de la forma precursora de la enzima (Catepsina D proforma), que no se daba en los estables. Sin embargo, la expresión de la enzima activa estaba aumentada, como demuestran los resultados proteómicos y también la inmunodetección. Esta tendencia se invierte a lo largo de la evolución de la enfermedad, hasta que la forma madura desaparece y la Catepsina D proforma vuelve a aparecer en los pacientes T=6m. Todo esto sugiere que durante el SCA aumenta la activación de la Catepsina D y, puesto que se trata de un marcador de diferenciación de monocitos a macrófagos [235], nuestros resultados podrían indicar que los monocitos circulantes en el SCA han iniciado parcialmente este proceso antes de entrar en la pared arterial. Por otro lado, la expresión de la Catepsina D proforma, que estaba ausente en pacientes T=2m, se normalizaba parcialmente por el tratamiento con Atorvastatina, lo que indica que esta terapia podría favorecer el proceso de normalización.

Proteínas de estrés

Las proteínas comentadas en los apartados previos presentaban un patrón de expresión alterado en los monocitos de los pacientes con SCA respecto al grupo de controles sanos y la mayor parte de ellas también estaban alteradas respecto a los pacientes estables. Sin embargo, encontramos cuatro proteínas implicadas en la respuesta celular al estrés que estaban diferencialmente expresadas tanto en los pacientes con SCA como en los estables respecto a los sanos. Por ello parece que no

estarían implicadas en la complicación de la placa, pero podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la aterosclerosis, lo que planteamos como hipótesis para futuros estudios.

La Paraoxonasa I (PON I) es parcialmente responsable de los efectos antioxidantes del HDL y se ha relacionado con la protección contra la aterotrombosis [236]. Los polimorfismos genéticos de PON I que tienen una menor capacidad para proteger contra la oxidación del LDL están asociados con una mayor incidencia de enfermedad coronaria [237]. La actividad de PON I en suero está reducida en pacientes con infarto de miocardio e individuos con diversos factores de riesgo cardiovascular [238]. Su ausencia en los monocitos de los pacientes estables podría indicar una falta de actividad antioxidante en la aterosclerosis coronaria crónica, enfermedad en la que el estrés oxidativo juega un papel fundamental. Por otra parte, en los pacientes T=2m(+ATV) la expresión de PON I se disparaba, estando incluso por encima de los niveles en los sanos. Esto sugiere otro mecanismo potencial para el efecto beneficioso del tratamiento con Atorvastatina, que concuerda con un trabajo previo en el que se demuestra que la Atorvastatina aumenta la actividad de PON I en plasma de sujetos hipercolesterolémicos [239], aunque los efectos de otras estatinas son menos consistentes [240, 241].

La HSP70 protege la función endotelial y está implicada en mecanismos antiapoptóticos que preservan el miocardio de la hipoxia [242, 243]. Es más, el aumento de los niveles séricos de esta proteína están asociados a un menor riesgo de sufrir enfermedad coronaria [243]. Por ello, podríamos decir que los pacientes con SCA y los pacientes estables carecen de las propiedades protectoras de la HSP70, ya que está disminuida o ausente en todos ellos. En los pacientes T=2m, los niveles de HSP70 están disminuidos respecto a los sanos y la forma constitutiva de la proteína, la HSC70, está completamente ausente. Sin embargo, la expresión de ambas se normalizaba en los pacientes tratados con Atorvastatina, lo que supone otro mecanismo de acción potencial de esta terapia. En este sentido, se ha observado que la Simvastatina potencia la expresión de HSP70 en las células endoteliales vasculares, favoreciendo la translocación al núcleo del Factor 1 de Choque Térmico [244].

La HSP60 está implicada en la aterogénesis, se encuentra en la placa de ateroma y es capaz de activar el endotelio, las células musculares lisas y los macrófagos [245, 246]. Además, los niveles séricos de HSP60 están aumentados en pacientes con un

infarto de miocardio previo, aunque su actividad proinflamatoria queda anulada mientras se encuentra dentro de las células [247]. La ausencia de HSP60 en los monocitos de todos los pacientes incluidos en nuestro estudio (pacientes con SCA y estables) podría deberse a la liberación de esta proteína al plasma. Por otra parte, el tratamiento con Atorvastatina normaliza la expresión de la HP60 en los monocitos, lo que no encaja de un modo claro con sus efectos aterogénicos. Sería necesario realizar estudios complementarios para comprobar que esta proteína pudiera ser liberada al plasma por los monocitos en los pacientes con SCA y que la Atorvastatina impidiese de algún modo esta liberación. Es más, aunque se ha comprobado que las estatinas reducen los títulos de anticuerpos contra la HSP60 en el plasma [248], por el momento no hay datos sobre los efectos de estas drogas sobre su expresión y nuestros resultados merecen ser objeto de futuras investigaciones.

Finalmente, el Oncogén DJ1 también estaba ausente en los pacientes con SCA y los estables. Esta proteína es una cochaperona de la HSP70 y juntas previenen la apoptosis de macrófagos inducida por Interferón-Gamma y Lipopolisacárido [249]. Por tanto, la ausencia de la chaperona conjunta HSP70/DJ1 podría potenciar la muerte apoptótica de los macrófagos, favoreciendo el proceso aterogénico [25].

Proteínas implicadas en procesos de inflamación y trombosis

La Anexina I es una proteína regulada por glucocorticoides que está implicada en la regulación de la fagocitosis, señalización celular y proliferación. Se ha postulado su intervención en la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides [250] y, entre otros efectos, inhibe la expresión de la L-selectina y de CD11/CD18 en los monocitos y otros tipos celulares [251]. Encontramos dos manchas proteicas que correspondían a esta proteína ausentes en los monocitos de los pacientes T=2m. Una de ellas era normalizada por el tratamiento con Atorvastatina y la otra incluso aumentaba su expresión respecto a los sanos. Por lo tanto, la Anexina I (o Lipocortina) podría ser un mediador de los efectos antiinflamatorios de las estatinas, aunque no existen datos sobre la influencia de estas drogas en la expresión de esta proteína.

La Anexina II es un receptor para el Activador de Plasminógeno en tejido y el Plasminógeno, para su conversión en Plasmina [252]. La Plasmina juega un papel principal en la prevención de la oclusión vascular, induciendo la ruptura del coágulo [253]. La Anexina II recombinante induce la generación de Plasmina por las células endoteliales humanas y ralentiza la oclusión de arterias carótidas trombosadas en un

modelo de rata [254]. Es más, la lipoproteína aterogénica y la homocisteína reducen la unión de la Anexina II al Plasminógeno y al Activador del Plasminógeno, respectivamente [255]. Por tanto, la Anexina II parece tener efectos antiaterotrombóticos y la normalización de las dos manchas proteicas que corresponden a esta proteína en los monocitos de los pacientes tratados con Atorvastatina sugiere un nuevo mecanismo protector de esta terapia. De todos modos, estos resultados requieren futuras investigaciones, ya que en trabajos previos se ha demostrado que las estatinas causan una disminución en los niveles de expresión de la Anexina II en macrófagos in vitro [252].

Las Ficolinas son lectinas compuestas por un dominio similar al Fibrinógeno y otro similar al Colágeno, que provocan la activación del complemento y participan en la inmunidad innata [256, 257]. Encontramos tres manchas proteicas con diferentes comportamientos que correspondían a Ficolinas. Dos de ellas estaban ausentes en los pacientes T=2m y el tratamiento con Atorvastatina aumentaba su expresión. La tercera mancha no estaba alterada en los pacientes T=2m respecto a los sanos y, sin embargo, estaba disminuida en los pacientes T=2m(+ATV). Puesto que no existen datos previos sobre el efecto de las estatinas en la regulación de la expresión de las Ficolinas en el SCA, estos resultados necesitan de futuros estudios para poder dilucidar si las estatinas producen efectos diferentes en las proteínas de esta familia.

Proteínas contráctiles y estructurales

La expresión de la proteína Vimentina estaba aumentada en los pacientes T=0, aunque sus niveles volvían a la normalidad en los pacientes T=4d. Esta proteína es el componente más común de los filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de casi todas las células eucariotas y es la primera que se expresa durante la diferenciación celular. La Vimentina se une al LDL oxidado (oxLDL) en los macrófagos y podría participar en el procesamiento intracelular de esta lipoproteína [258]. También está implicada en la diferenciación de las células musculares lisas [259]. Un análisis proteómico reciente ha descrito un aumento de la Vimentina en los monocitos THP-1 humanos estimulados con oxLDL [179]. El aumento de la expresión de esta proteína en los pacientes T=0 sugiere un papel de esta proteína en el desencadenamiento del SCA, aunque se requieren futuros estudios para probarlo.

La Estatmina es una proteína con un papel crucial en la regulación del citoesqueleto microtubular y en la regulación del ciclo celular [260, 261]. Su expresión no estaba alterada en los pacientes T=2m, pero estaba aumentada en los pacientes T=2m(+ATV). Está demostrado que la exposición de las células endoteliales humanas al oxLDL provoca la inactivación y la disminución de los niveles de esta proteína [173], pero no existen datos sobre la influencia de las estatinas en su función y expresión. Nuestros hallazgos sugieren que el aumento de la expresión de esta proteína podría participar en la acción antiproliferativa de las estatinas.

Otras funciones

La Timidina-fosforilasa ha sido recientemente relacionada con la inhibición de la proliferación de las células musculares lisas de la pared vascular [262], un fenómeno biológico implicado en la fisiopatología de la aterosclerosis. Además, activa la neoangiogénesis [263], un proceso que alivia las consecuencias de la enfermedad coronaria, ya que los nuevos vasos formados pueden aportar sangre y oxígeno a las regiones del miocardio amenazadas por el estrechamiento de las arterias coronarias por las lesiones ateroscleróticas. La ausencia de expresión del precursor de la Timidina-fosforilasa en los monocitos de los pacientes T=0 puede suponer la carencia de estos efectos protectores.

Las S100 son una familia de proteínas de unión a calcio que han sido descritas como marcadores útiles de infarto y otros daños cerebrales [264, 265]. También son ligandos de los receptores para productos de glicosilación avanzados, que son importantes mediadores del daño vascular y se ha comprobado que aceleran la aterogénesis en modelos de ratón [266, 267]. La S100A8 (Calgranulina) se expresa constitutivamente a elevadas concentraciones en granulocitos y durante etapas tempranas de la diferenciación de los monocitos [266, 267]. Regula la fosforilación, la actividad de la NADPH-oxidasas y el transporte de ácidos grasos en monocitos y neutrófilos [268]. Esta proteína tiene también propiedades quimiotácticas y ha sido relacionada con procesos inflamatorios, incluyendo la aterosclerosis [265], estando presente en macrófagos y células espumosas de la placa de ateroma humana [268]. De todos modos, la proteína S100A8 se encontraba ausente en los monocitos de los pacientes T=0, mientras que se expresaba con normalidad en los pacientes estables. Este resultado, que se confirmó mediante inmunodetección, podría indicar una relación entre la desaparición de la S100A8 y el inicio del SCA. Otro miembro de esta familia, la

S100A9, que se sobreexpresa en los leucocitos de sangre periférica en pacientes con isquemia cerebral [269], estaba ausente en los Pacientes T=2m y el tratamiento con Atorvastatina normalizaba su expresión. Como en el caso de la HSP60, estos resultados no encajan bien con las potenciales propiedades proaterogénicas de esta familia de proteínas, por lo que será necesario realizar estudios posteriores.

La Angiogenina es una ribonucleasa implicada en la angiogénesis, que induce la proliferación, migración y activación de proteasas en las células musculares lisas y endoteliales, cuyos efectos se modulan cuando se acopla al Inhibidor de Ribonucleasa [270]. El complejo Inhibidor de Ribonucleasa-Angiogenina estaba ausente en los monocitos de los pacientes T=2m y se normalizaban en los pacientes T=2m(+ATV). Por tanto, el tratamiento con Atorvastatina podría inhibir la acción de la Angiogenina al favorecer la formación del complejo con su inhibidor.

La Prohibitina se localiza en multitud de compartimentos celulares y está implicada en el desarrollo normal y estabilidad mitocondrial [271]. La disminución de su expresión se ha relacionado con el daño causado por los radicales de oxígeno procedentes de la mitocondria [272]. Dado el papel que desempeña la disfunción mitocondrial en las enfermedades relacionadas con la edad (obesidad, diabetes y síndrome metabólico), esta proteína podría tener interés en el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de estas afecciones [272]. Además, la Prohibitina tiene efectos proapoptóticos, antiinflamatorios e incluso podría ejercer una función de supresión de tumores [272]. El tratamiento con Atorvastatina normaliza la expresión de esta proteína, que estaba ausente en los pacientes T=2m, lo que sugiere otro mecanismo potencialmente protector de este tratamiento.

B) PLASMA

Como se ha señalado anteriormente, la sangre humana es una de las muestras clínicas más accesibles y supone la fuente de información más importante en la investigación de diferentes enfermedades y los efectos de diversos fármacos. Sin embargo, el plasma no se ha utilizado a menudo en proteómica clínica, ya que la metodología proteómica más comúnmente usada para la identificación de biomarcadores (2-DE e identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas) ha tenido más éxito al aplicarla a tejidos sólidos. El enorme rango dinámico que separa la proteína más abundante del plasma (la albúmina) y las más escasas en unos 10^9 órdenes de magnitud, junto con la aglomeración de puntos en los geles

bidimensionales en la región entre 45-80 KDa y en el rango de punto isoeléctrico entre 4,5-6, hacen que el análisis del plasma mediante 2-DE sea una tarea muy complicada. Una posible solución a este problema podría ser la aplicación de diferentes técnicas de separación de proteínas basadas en diversos métodos de afinidad [197-200]. En 2003, Pieper y colaboradores [196] desarrollaron una estrategia para generar matrices de inmuoafinidad múltiple, muy eficaces a la hora de eliminar de forma específica y reproducible las proteínas más abundantes del plasma. A la vista de sus resultados, consideramos que podría tratarse de un método adecuado para analizar la expresión diferencial de proteínas en el plasma de los pacientes con SCA mediante electroforesis bidimensional. Por ello, decidimos utilizar un sistema comercial semejante al que ellos emplearon (Multiple Affinity Removal System, Agilent Technologies), que estaba optimizado para la depleción de las seis proteínas mayoritarias del plasma humano. Este sistema era el más eficaz y reproducible que existía en el mercado en el momento de comenzar nuestro estudio.

Por otra parte, durante las etapas previas al desarrollo de esta tesis se publicaron los primeros estudios basados en la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) [273-276]. Esta tecnología supone un gran avance en proteómica comparativa, ya que presenta grandes ventajas respecto a la 2-DE convencional, permitiendo una mejora en la linealidad en el rango dinámico de detección, así como una mayor reproducibilidad y un método de cuantificación más fiable. Por ello, decidimos incorporarla a nuestro estudio comparativo. Sin embargo, tras las primeras pruebas, pudimos comprobar que, aunque el número de manchas proteicas detectadas por los respectivos programas de análisis de imagen era similar en los dos tipos de geles (2-DE y 2D-DIGE), la distribución de las mismas era diferente. Esto se debe a que la región superior (60-120 kDa) de los geles teñidos con plata el solapamiento, la saturación y la baja resolución de las manchas proteicas impedían al programa una correcta detección y cuantificación de las mismas. En cambio, las manchas de esta misma región en los geles 2D-DIGE se resolvían muy bien, mientras que el número de manchas detectadas en la región inferior (0-60 kDa) era mucho menor al de los geles teñidos con plata. Por ello, nos pareció interesante realizar nuestro estudio utilizando estas dos técnicas complementarias.

El análisis mediante 2-DE del plasma deplecionado de los pacientes con SCA incluidos en el estudio mostró 52 manchas proteicas diferencialmente expresadas en los pacientes con SCA respecto a los sanos y 55 manchas variadas respecto a los estables,

43 de las cuales coincidían en ambas comparaciones. En el global, teniendo en cuenta ambas comparaciones, el análisis encontró 64 manchas proteicas expresadas diferencialmente, de las cuales pudimos identificar 56 mediante espectrometría de masas. En este primer análisis, el número de manchas diferencialmente expresadas en los pacientes con SCA respecto a los individuos sanos no tiende a disminuir con el tiempo como ocurría en el caso de los monocitos, sino que desciende a los 4 días pero luego tiende al alza. En la comparación con los estables las diferencias tampoco tienden a disminuir, sino que se mantienen en unos valores similares en todos los grupos estudiados. Resulta llamativo el hecho de que el mayor número de diferencias aparece en las comparaciones con los pacientes estables, lo que sugiere que el plasma de los pacientes estables es muy diferente al del resto de los grupos. En el caso del análisis mediante 2D_DIGE, encontramos 49 manchas con alteraciones en sus niveles de expresión en los pacientes con SCA respecto a los sanos, 47 de las cuales también presentaban alteraciones en la comparación con los estables. En esta última comparación aparecieron además 8 nuevas manchas diferencialmente expresadas, lo que hace un total de 55 diferencias con los estables. Teniendo en cuenta las dos comparaciones, el análisis mostró 57 manchas con expresión diferencial, de las cuales identificamos 55. Como ocurría en el análisis anterior, existe una ligera tendencia al alza en el número de diferencias detectadas en la comparación con los sanos, siendo mínimo en el momento del ingreso y aumentando progresivamente (a excepción de los pacientes T=4d, donde el número de alteraciones se dispara puntualmente). En cambio, la tendencia en la comparación con los pacientes estables es más difícil de percibir, aunque parece que el número de diferencias tiende ligeramente a descender con el tiempo. A pesar de ello, si tenemos en cuenta las cifras absolutas, de nuevo el número de diferencias es mayor en la comparación con los pacientes estables que al comparar con los sanos (excepto T=4d, que muestra el mismo número de diferencias en ambos casos).

Además, quisimos estudiar los efectos que producía el tratamiento con Atorvastatina en el plasma de los pacientes que recibieron este tratamiento ya que, aunque los estudios PROVE-IT y REVERSAL mostraron un mayor beneficio en los pacientes tratados con Atorvastatina en los que hubo una mayor reducción de los niveles plasmáticos de LDL y Proteína C-reactiva [46, 277], sus efectos sobre otras proteínas en el plasma son poco conocidos. En este caso, el análisis mediante 2-DE mostró que el

tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d durante los dos meses siguientes al SCA modificaba la expresión de 19 manchas, de las cuales 17 pudieron ser identificadas. Por su parte, el análisis mediante 2D-DIGE reveló que el tratamiento con Atorvastatina causaba variaciones en la expresión de 33 manchas proteicas, de las cuales 32 fueron identificadas con éxito.

El análisis mediante 2D-DIGE nos permitió realizar diferentes tipos de análisis multivariante con dos objetivos principales: por un lado, tratar de evaluar la capacidad de los perfiles de expresión definidos por los mapas bidimensionales del plasma deplecionado para clasificar los grupos que se estaban estudiando y, por otro lado, buscar aquellos conjuntos de proteínas diferencialmente expresadas que mostrasen patrones de expresión similares en los diferentes grupos. El análisis de componentes principales (ACP) representa las medidas numéricas de varias variables en un espacio de pocas dimensiones para facilitarnos la interpretación de los datos [204]. Esta reducción de dimensionalidad evidencia relaciones entre los datos que las dimensiones superiores enmascaran a nuestra percepción. Así, en el gráfico de puntuación obtenido para las 30 muestras estudiadas (figura R_16B), apreciamos cierto agrupamiento de las muestras correspondientes a cada grupo experimental, lo que indica que los perfiles de expresión obtenidos permiten distinguir los grupos de estudio. Observamos que el primer componente principal (eje vertical), que es el que tiene más importancia en la varianza total, separa fundamentalmente los pacientes con SCA T=0, T=4d y T=2m (a la derecha) de los pacientes estables (a la izquierda), mientras que los sanos y los pacientes T=6m se reparten a ambos lados del eje. En cambio, el segundo componente (eje horizontal) separa los sanos y pacientes T=0 (abajo) de los pacientes con SCA T=4d y T=2m (arriba), mientras que los pacientes T=6m y estables se distribuyen a ambos lados del eje. Cabe destacar que la distribución de los pacientes estables en el gráfico, bien separados del resto de los grupos, vuelve a sugerir que se trata de un grupo con un perfil de expresión diferente al resto. Por su parte, la distribución de los pacientes T=0 parece reflejar una cierta tendencia del estado “Sano” hacia el “SCA” y la distribución de los pacientes T=6m el segundo caso, tiende del estado “SCA” hacia un estado entre “Sano” y “Estable”. Por tanto, estos datos indican que los perfiles de expresión permiten incluso apreciar cierto grado de relación entre algunos de los grupos de estudio. Algo similar ocurre al realizar el análisis de grupos jerárquico (figura R_17), donde también podemos observar un cierto grado de agrupación en las muestras.

Debemos recordar que se realizaron dos tipos de clasificación, estimando la similitud mediante dos parámetros diferentes, para ver si había diferencias al clasificar los datos según los valores absolutos (distancia Euclídea) o según las tendencias en los patrones de expresión (coeficiente de Pearson), cosa que efectivamente ocurre. En el primer caso, las muestras se agrupan de manera que los estables aparecen todos juntos en el extremo derecho del panel y a su lado aparecen intercalados los sanos, los pacientes T=0 y dos pacientes T=6m. En la parte izquierda del panel aparecen mezclados el resto de los pacientes con SCA. Curiosamente, en la clasificación mediante el coeficiente de Pearson los estables aparecen entre los pacientes T=0 y los sanos, lo que sugiere que, según la tendencia en los patrones de expresión, los estables ocuparían un lugar intermedio entre los sanos y los pacientes con SCA. En cuanto a los grupos de manchas proteicas con perfiles de expresión similares, en la clasificación mediante la distancia Euclídea se distinguen dos grupos en el conjunto de 21 manchas con expresión diferencial seleccionadas, uno de ellos con 3 manchas (488, 489 y 492) y otro con 19. La clasificación mediante el coeficiente de Pearson en cambio define 5 grupos, uno de los cuales contiene 4 manchas (240, 488, 489 y 492), coincidiendo prácticamente con el grupo de 3 manchas determinado anteriormente. Curiosamente, la clasificación de k-medias (figura R_18) agrupó las manchas proteicas en los mismos dos conjuntos que la clasificación jerárquica mediante la distancia Euclídea, presentando el grupo de 3 manchas un muy buen valor q, lo que indica que estas 3 manchas presentan un perfil de expresión muy similar. Sin embargo, la clasificación mediante mapas auto-organizativos que utilizó esta misma medida de similitud (figura R_19) encontró 4 grupos, aunque uno de ellos (el que obtuvo el mejor valor q) resultó ser el mismo grupo de 3 manchas proteicas (488, 489 y 492). Por su parte, la clasificación mediante mapas auto-organizativos que estima la similitud mediante el coeficiente de Pearson (figura R_20) halló 5 grupos de manchas proteicas, uno de los cuales coincidía con el grupo de 4 manchas (240, 488, 489 y 492) de la clasificación jerárquica mediante el mismo coeficiente. No obstante, el valor q obtenido por este grupo mostraba una mayor heterogeneidad en los perfiles de expresión de estas manchas, lo que se explica por la mancha 240, que es la única diferencia con el grupo de 3 manchas definido en las clasificaciones anteriores. Si observamos el perfil de expresión de este grupo de manchas (488, 489 y 492) en los diferentes grupos de estudio, podemos apreciar que hay una elevación de los niveles de expresión (más o menos acusada) en los pacientes T=0, que va disminuyendo progresivamente hasta llegar en los estables a niveles

similares o incluso inferiores a los sanos. Efectivamente, la mancha 240 no se ajusta del todo a este patrón, ya que los niveles en los pacientes T=6m están elevados por encima del que muestran los pacientes T=0, cosa que no ocurre en el resto de las manchas del grupo. Si además de todo esto tenemos en cuenta que la mancha 489 es el valor extremo o atípico en el ACP, todos estos datos apuntan a que las manchas 488, 489 y 492 podrían ser tomadas en conjunto como un potencial marcador de SCA.

Respecto al experimento 2D-DIGE realizado para comprobar el efecto del tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d durante los dos meses siguientes al SCA, el ACP permite de nuevo apreciar el agrupamiento de las muestras pertenecientes a cada grupo experimental (figura R_23). El primer componente principal (eje vertical) en este caso separa los pacientes de los sanos y el segundo componente principal (eje horizontal) separa los pacientes tratados con Atorvastatina de los que recibieron la terapia convencional. En este caso, la clasificación jerárquica (figura R_24) prácticamente no muestra diferencias al utilizar la distancia Euclídea o el coeficiente de Pearson, separando los tres grupos perfectamente y situando en ambos casos a los pacientes T=2m entre los sanos y los pacientes T=2m(+ATV). La clasificación de las manchas proteicas es también muy similar y tanto la distancia Euclídea como el coeficiente de Pearson parecen definir 3 grupos. La clasificación de k-medias (figura R_25) coincidió casi por completo con los grupos determinados por la clasificación jerárquica mediante la distancia Euclídea, que definió tres grupos, uno de ellos formado por cinco manchas (172, 363, 368, 404, 664), otro por 9 (751, 774, 947, 219, 345, 380, 450, 473, 514, 552) y el último, con el mejor valor q, formado por solo 2 manchas proteicas (562 y 853). Sin embargo, la clasificación mediante mapas auto-organizativos basada en la misma distancia (figura R_26), encontró 5 grupos. Uno de ellos, formado por 6 manchas (831, 172, 363, 368, 404, 664), es muy parecido al grupo de 5 manchas que aparece en la clasificación de k-medias, pero presenta un peor valor q, probablemente debido al comportamiento de la mancha 831 no se ajusta del todo al patrón del resto del grupo. También aparece el conjunto formado por dos manchas proteicas (562 y 853), que de nuevo presenta el mejor valor q. En cambio, aparece otro grupo nuevo de 5 manchas con muy buen valor q (345, 380, 450, 473, 514) que no aparecía en la clasificación de k-medias. Por último en la clasificación mediante mapas auto-organizativos basada en el coeficiente de Pearson (figura R_27) aparecen 3 grupos de manchas proteicas (coincidiendo con la clasificación jerárquica basada en el mismo coeficiente). Aunque

no aparece el grupo de 2 manchas (562 y 853), sí aparece el mismo grupo de 6 manchas de la clasificación anterior (831, 172, 363, 368, 404, 664), que incluía las 5 manchas del grupo definido en la clasificación de k-medias (172, 363, 368, 404, 664). Curiosamente, ninguno de los grupos de manchas señalados en esta ocasión incluye el valor extremo o atípico detectado en el ACP (mancha 882), cuyo comportamiento parece ser completamente diferente al de las restantes 18 manchas incluidas en el análisis. Por tanto, teniendo en cuenta todos estos datos no podemos destacar claramente un grupo concreto como potencial marcador de tratamiento, aunque hay dos grupos que podrían ser interesantes. El primero de ellos se compone de cinco manchas (172, 363, 368, 404, 664) cuyos niveles parecen estar elevados con la terapia convencional, mientras que el tratamiento con Atorvastatina los normalizaría parcialmente. El segundo grupo estaría formado por dos manchas (562 y 853) cuyos niveles de expresión son similares en los pacientes que recibieron la terapia convencional y los sanos, pero el tratamiento con Atorvastatina los hace disminuir drásticamente.

En cuanto a las identificaciones, el conjunto de los análisis del plasma deplecionado de los pacientes con SCA que habían recibido un tratamiento convencional encontró en total 113 manchas proteicas diferencialmente expresadas, 64 mediante 2-DE y 57 mediante 2D-DIGE. De las 64 manchas encontradas mediante 2-DE, pudimos identificar 56 que correspondían en realidad a potenciales isoformas de 22 proteínas diferentes (19 al comparar con los sanos y 20 con los estables). De las 57 manchas con expresión diferencial halladas mediante 2D-DIGE, identificamos 55 que pertenecían a isoformas potenciales de 23 proteínas diferentes (22 al comparar con los sanos y 23 con los estables). Por su parte, el análisis del plasma deplecionado de los pacientes con SCA que habían recibido el tratamiento con Atorvastatina reveló un total de 48 manchas proteicas expresadas diferencialmente, 33 mediante 2D-DIGE y 19 mediante 2-DE. De estas 19 pudieron ser identificadas 17, que pertenecen a posibles isoformas de 11 proteínas diferentes, mientras que de las otras 33 se identificaron 32 correspondientes a isoformas potenciales de 15 proteínas diferentes. Teniendo en cuenta todos estos datos en conjunto, de las 137 manchas proteicas que mostraron alteraciones en sus niveles de expresión en alguna de las comparaciones realizadas, 125 fueron identificadas con éxito. Estas 125 manchas correspondieron en realidad a potenciales isoformas de 39 proteínas diferentes, que aparecen resumidas en la tabla TD_01.

Proteína	HUPO	Anderson
Alpha-1-B-glycoprotein	NO	NO
Alpha-2-HS-glycoprotein	SÍ (T8)	NO
Alpha-2-macroglobulin	SÍ (T4)	SÍ
AMBP protein	NO	NO
Amyloid related serum protein SAA	SÍ (T1)	SÍ
Angiotensinogen	SÍ (T2)	SÍ
Antithrombin-III	NO	SÍ
Apolipoprotein A-I	SÍ (T2)	SÍ
Apolipoprotein A-IV	SÍ (T2)	SÍ
Apolipoprotein E	SÍ (T2)	SÍ
Apolipoprotein J	NO	SÍ
Beta-2-glycoprotein	SÍ (T2)	SÍ
Beta-Actin	SÍ (T5)	NO
CD5 antigen-like	SÍ (T1)	NO
Chloride intracellular channel 1	NO	NO
Complement C1r	SÍ (T1)	NO
Complement C3	NO	SÍ
Complement factor B	NO	NO
Complement factor H	NO	NO
Complex-forming glycoprotein HC	NO	NO
Fibrinogen Beta	SÍ (T2)	SÍ
Fibrinogen Gamma	SÍ (T2)	SÍ
Gelsolin	SÍ (T3)	NO
Hakata antigen	NO	NO
Hemopexin	SÍ (T1)	SÍ
Inter-alpha-trypsin inhibitor	NO	NO
Kininogen 1	SÍ (T1)	NO
Leucine-rich Alpha-2-glycoprotein	SÍ (T1)	NO
Peroxiredoxin-2	SÍ (T1)	NO
Pigment epithelium-derived factor	SÍ (T1)	NO
PRO2222 (HRBP)	SÍ (T4)	NO
Serum Amyloid P-component	NO	NO
Tetranectin	NO	NO
TPM4	NO	NO
Transthyretin	NO	NO
Triosephosphate Isomerase	SÍ (T1)	NO
Vitamin D Binding Protein	NO	NO
Vitronectin	SÍ (T1)	SÍ
Zinc-alpha-2-glycoprotein	NO	NO

Tabla TD_01: Lista de las proteínas identificadas en esta Tesis. La columna “HUPO” indica si la proteína había sido incluida entre las proteínas relacionadas con el sistema cardiovascular identificadas y agrupadas en diferentes tablas en la fase piloto Proyecto Proteoma del Plasma de la HUPO [278]. La columna “Anderson” indica si estas proteínas habían sido recogidas como potenciales biomarcadores de enfermedad cardiovascular en la revisión publicada por L. Anderson [279]. SÍ, indica que la proteína estaba incluida en la publicación; NO, indica que la proteína no estaba incluida en la publicación; (T1), incluida en la Tabla 1, que recoge los marcadores de inflamación y/o Enfermedad Cardiovascular identificados en plasma; (T2), incluida en la Tabla 2, que recoge las proteínas vasculares y de coagulación identificadas en el plasma; (T3), incluida en la Tabla 3, que recoge las proteínas de señalización identificadas en plasma; (T4), incluida en la Tabla 4, que recoge las proteínas asociadas a crecimiento y diferenciación identificadas en plasma; (T5), incluida en la Tabla 5, que recoge las proteínas del citoesqueleto identificadas en plasma; (T6), incluida en la Tabla 6, que recoge los factores de transcripción identificados en plasma; (T7), incluida en la Tabla 7, que recoge canales y receptores identificados en plasma; (T8), incluida en la Tabla 8, que recoge proteínas de fallo cardíaco y asociadas a remodelación identificadas en plasma.

En esta misma tabla se detalla también si estas proteínas habían sido recogidas como potenciales biomarcadores de enfermedad cardiovascular en la revisión publicada por Leigh Anderson en 2005 [279], o como proteínas relacionadas con el sistema cardiovascular identificadas en la fase piloto Proyecto Proteoma del Plasma de la Organización del Proteoma Humano (“Human Proteome Organisation”, HUPO) [278]. Se definieron seis categorías funcionales diferentes para agrupar las 39 proteínas identificadas, de las cuales comentaremos a continuación las que resultaron ser más interesantes.

Proteínas de la coagulación

El fibrinógeno es una proteína directamente implicada en la cascada de la coagulación, fundamental en la formación de la fibrina [280], molécula que participa directamente en la formación del trombo y que condiciona la viscosidad plasmática, relacionada con una mayor probabilidad de eventos isquémicos en pacientes con SCA [281]. La fibrina se deposita formando una red que constituye la región roja del trombo y también interviene en los mecanismos que provocan agregación plaquetaria [282]. Varios estudios epidemiológicos [283-287] han demostrado que el fibrinógeno es un factor de riesgo cardiovascular. De hecho, se ha comprobado que los niveles de fibrinógeno están elevados en el plasma de pacientes con cardiopatía isquémica respecto a controles sanos [288-290], llegando a relacionar los niveles elevados de fibrinógeno con una mayor tasa de isquemia recurrente [291]. En nuestros pacientes hemos encontrado alteraciones en los niveles de expresión de múltiples isoformas, tanto de Fibrinógeno Gamma como de Fibrinógeno Beta. Algunas de ellas se ven disminuidas pero la mayoría están elevadas respecto a los controles sanos. Por ello, resulta complicado interpretar estos datos y será necesario realizar nuevos estudios para tratar de esclarecerlos.

La β -2-Glicoproteína (también conocida como Apolipoproteína H) es una proteína abundante del plasma de 50 kDa capaz de asociarse elementos aniónicos [292], considerada como proteína de unión a fosfolípidos. Por el momento, su papel fisiológico aún no está claro, aunque se le han atribuido propiedades anticoagulantes [293-295]. De hecho, se sabe que puede intervenir en diversos puntos de la cascada de coagulación [296] y recientemente ha sido propuesto como marcador de infarto cerebral [297]. Además se le han atribuido otras propiedades, como la capacidad de unirse a oxLDL, por lo que podría tratarse de una proteína antiaterogénica [298]. El aumento de

los niveles de expresión de esta proteína en el plasma de los pacientes estables respecto a los controles sanos podría tener por tanto una acción dual, favoreciendo la inhibición de la coagulación y evitando a la vez la progresión de la aterosclerosis.

El Kininógeno es una proteína multifuncional cuya participación en la vía intrínseca de la coagulación está bien establecida, formando parte del sistema Kalikreína-Kininas [299, 300]. El procesamiento proteolítico del Kininógeno implica la liberación del nonapéptido denominado Bradikinina, un mediador vasoactivo y proinflamatorio, mientras que el resto de la molécula posee propiedades antiadhesivas [301] y de inhibición de la agregación plaquetaria [302]. Como en el caso anterior, los pacientes estables muestran una elevación de los niveles de Kininógeno respecto a los sanos, lo que de nuevo contribuiría a un estado anticoagulante en estos pacientes. Además, hemos observado que los niveles de expresión de Kininógeno, que mostraban un descenso en los pacientes T=2m, eran normalizados por la terapia con Atorvastatina.

Proteínas del metabolismo y/o transporte de lípidos

La Apolipoproteína A-I (ApoA-I) es la apolipoproteína principal en las partículas HDL, estando fuertemente asociados sus niveles plasmáticos a los de estos complejos anti-aterogénicos, que son los principales mediadores del transporte reverso del colesterol desde el vaso sanguíneo hacia el hígado [303]. Se ha sugerido la existencia de una relación inversa entre los niveles plasmáticos de ApoA-I y la enfermedad coronaria [304, 305]. De hecho, se le han atribuido algunos efectos protectores [306] e incluso se ha descrito una variante de esta proteína que parece ser capaz de producir la regresión de la placa de ateroma en un modelo animal [307]. En nuestro estudio encontramos algunas alteraciones leves en los niveles de expresión de varias isoformas en los pacientes con SCA respecto a los controles sanos, aunque observamos elevaciones en unos casos y disminuciones en otros. Esto nos hace pensar que podría tratarse de una transformación de unas isoformas en otras más que de un cambio en los niveles de expresión globales, aunque será necesario realizar estudios complementarios para comprobarlo. En cambio, los pacientes estables también presentan alteraciones en varias isoformas de ApoA-I, pero todas ellas están aumentadas y en algunos casos las elevaciones son considerables. Sin embargo, el tratamiento con Atorvastatina parece tender a reducir la presencia de ApoA-I en el plasma de los pacientes que recibieron este tratamiento frente a los que fueron tratados con la terapia convencional. En este sentido, existen ensayos clínicos que sugieren tanto un efecto positivo [308], como

negativo [309] de la Atorvastatina sobre la concentración de ApoA-I. Sin embargo, parece ser la reducción de los niveles de colesterol plasmático que ejerce este tratamiento no está mediada por cambios en los niveles de expresión de ApoA-I, sino por el aumento de las partículas grandes de colesterol HDL, responsables del transporte reverso del colesterol al hígado [310]. Por ello, nuestro estudio necesitaría ser complementado con otras técnicas para comprobar si el efecto del tratamiento con Atorvastatina sobre la ApoA-I no afecta a las partículas HDL.

La Apolipoproteína E (ApoE) es una proteína polimórfica y multifuncional [311] que desempeña un papel clave en el metabolismo del colesterol y los triglicéridos, interviniendo en el catabolismo de los quilomicrones y de las partículas VLDL [312]. El modelo de ratón ha resultado ser muy útil para investigar los mecanismos de la aterogénesis y su modulación por ApoE [313], ya que los ratones deficientes en ApoE tienen los niveles plasmáticos de colesterol elevados, como consecuencia de un catabolismo incorrecto de las lipoproteínas ricas en colesterol [314]. Estos ratones desarrollan lesiones ateroscleróticas complejas y se ha comprobado cuando se les aporta ApoE [315-317] se reducen sus niveles de colesterol en plasma, proporcionándoles además protección contra la progresión de la aterosclerosis. Esto indica que ApoE es fundamental en el mantenimiento de los niveles de colesterol en el plasma [318], aunque también se sabe que la regresión del proceso aterosclerótico que es capaz de producir es independiente de la regulación de los niveles de colesterol [319]. No obstante, hemos observado que los niveles de ApoE están disminuidos en los pacientes estables respecto a los sanos. Se trata de un resultado inesperado que merece ser objeto de un estudio complementario.

La Apolipoproteína A-IV (ApoA-IV) es una glicoproteína de 46 kDa que viaja en el plasma formando parte de los quilomicrones, VLDL, HDL, o bien sin asociarse a lipoproteínas [320-322]. La ApoA-IV juega un importante papel en el transporte reverso del colesterol y promueve la formación de partículas HDL [323, 324], mediante la activación de la enzima Lecitín Acil Colesterol Transferasa (LCAT) [325]. Utilizando modelos de ratón susceptibles a desarrollar aterosclerosis (ratones alimentados con una dieta rica en grasas, o ratones deficientes en ApoE) se ha demostrado que la sobreexpresión de ApoA-IV desempeña un papel protector, reduciendo las lesiones ateroscleróticas en los ratones [326-328]. Esta protección podría tener relación con la capacidad de esta proteína, para inhibir la oxidación de las lipoproteínas [329]. Se ha

descrito una asociación inversa entre los niveles plasmáticos de ApoA-IV y la enfermedad coronaria [330]. Cuatro días después del episodio agudo detectamos una disminución puntual en dos de las isoformas plasmáticas de ApoA-IV cuyos niveles se recuperan posteriormente. Los pacientes estables muestran una isoforma (la más ácida y minoritaria) disminuida, pero en cambio otras dos isoformas (las más básicas y mayoritarias) están aumentadas. Estos datos sugieren de nuevo que en los pacientes estables tiene lugar un procesamiento de las isoformas diferente al de los individuos sanos, aumentando la concentración de unas respecto a otras pero sin alterar los niveles globales de expresión.

La Apolipoproteína J, también conocida como Clusterina, es una glicoproteína presente en una subpoblación de las partículas HDL junto con la Paraoxonasa y la Apolipoproteína AI [331, 332]. Aunque su función no está clara todavía, se le ha relacionado con la regulación del complemento [333], respuesta de fase aguda [334], transporte de lípidos [335], apoptosis [336-339] y protección de membranas en las interfases tejido-fluido donde se expresa [340]. Estas propiedades sugieren que la Apolipoproteína J podría proteger el endotelio vascular contra factores como los componentes finales de la cascada del complemento [341]. La ApoJ también se ha detectado en las lesiones ateroscleróticas y su expresión aumenta con la progresión de la aterosclerosis [342]. Además, se ha comprobado que la expresión de Apo J se induce en las células del músculo liso vascular tras el daño vascular y que dicha expresión estimula la proliferación y la migración de las mismas [343, 344]. Una isoforma de esta proteína está disminuida en el plasma de todos los pacientes con SCA respecto a los controles sanos. Una segunda isoforma aparece disminuida a partir del cuarto día y ya no se recupera, estando disminuida incluso en los pacientes estables, en los que la primera isoforma presenta niveles normales. Por último, el tratamiento con Atorvastatina normaliza las isoformas, parcialmente una y por completo la otra. Todos estos datos nos hacen pensar que en los pacientes estables podría tener lugar un reajuste del metabolismo lipídico, lo que debe ser objeto de futuras investigaciones.

Proteínas de inflamación y respuesta inmune

La Proteína Amiloide A del Suero (SAA) es una proteína de fase aguda que en los últimos años ha sido identificada como un biomarcador potencial de varias patologías, incluyendo el infarto de miocardio, enfermedad inflamatoria y amiloidosis [345]. Se trata de una familia compleja de cuatro genes que aparecen en un gran número de

especies, incluida la humana [346]. Tres de estos genes se expresan comúnmente en humanos (SAA1, SAA2 y SAA4), dando lugar a proteínas que actúan como apolipoproteínas, ya que participan en el transporte de las partículas HDL [347]. Durante una respuesta de fase aguda (la reacción del cuerpo al inicio inmediato de los estímulos inflamatorios con el fin de contrarrestar el daño tisular, la infección y/o los traumatismos [348, 349]) los niveles de SAA1 y SAA2 en plasma han mostrado grandes incrementos de la concentración basal [350]. Por ello, SAA1 y SAA2 (llamados conjuntamente SAA o A-SAA [315]) han sido identificados como biomarcadores particularmente útiles en la evaluación de diversos procesos inflamatorios [350, 351]. Así ocurre en nuestros pacientes, donde los niveles de expresión de SAA están elevados en el momento del ingreso y cuatro días después del episodio agudo, mientras que posteriormente se normalizan.

El Componente P Amiloide del Suero (SAP) es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado, que pertenece a la misma familia que la Proteína C-Reactiva (Pentraxinas) y está implicada en la respuesta de fase aguda [352]. La SAP aparece siempre en los depósitos amiloides [353], y se ha demostrado que es capaz de unirse a múltiples ligandos como la fibronectina [354], la proteína C-Reactiva [355] y algunos componentes de la cascada del complemento [354, 356, 357]. Además, cuando la SAP se une a células en apoptosis, provoca que los macrófagos derivados de monocitos las fagociten [358]. También se ha comprobado su presencia en las lesiones ateroscleróticas [359] y el estudio de su papel potencial junto con el de otros elementos de la respuesta inmune innata representa un campo emergente en la investigación del proceso aterogénico [360]. Los niveles de una isoforma de SAP están elevados en el plasma de los pacientes T=4d, pero posteriormente regresan a sus niveles normales, por lo que la elevación podría atribuirse a la respuesta de fase aguda. No obstante, el tratamiento con Atorvastatina eleva los niveles de una isoforma diferente que en ningún otro grupo aparece alterada. Puesto que por el momento no hay datos sobre los efectos de este fármaco sobre la expresión de esta proteína, este resultado merece ser considerado para futuras investigaciones.

El Antígeno similar a CD5 se conoce también como Proteína Sp α . Se trata de una glicoproteína soluble de 38 kDa expresada por macrófagos en tejidos [361], que favorece la supervivencia de los mismos frente a diferentes estímulos inductores de apoptosis [361, 362]. Recientemente se ha demostrado que la presencia del Antígeno

similar a CD5 aumenta la supervivencia de los macrófagos también en las lesiones ateroscleróticas y que su ausencia atenúa el desarrollo de las lesiones tempranas al intensificar la apoptosis de estas células [363]. En este estudio, hemos detectado una disminución de los niveles de expresión de esta proteína seis meses después del episodio agudo que se acentúa en los pacientes estables, lo que sugiere que esta proteína podría tener un papel en la estabilización de la lesión tras el SCA.

La α -2-HS-Glicoproteína (Glicoproteína-2-Heremans Schmid), también conocida como Fetuina-A, es una glicoproteína de 59 kDa sintetizada en el hígado que está regulada como proteína negativa de la fase aguda, disminuyendo su concentración plasmática durante la respuesta inflamatoria aguda [364]. Se sabe que participa en la actividad de los macrófagos, estimulando su función fagocítica [365] y opsonizando moléculas capaces de desactivarlos [366]. Además, ha sido identificada como un potente inhibidor del proceso de calcificación [367] y existe una relación inversa entre la α -2-HS-Glicoproteína y la Proteína C-Reactiva [368]. Estudios más recientes la han implicado en el desarrollo de placas de ateroma calcificadas en pacientes diabéticos [369]. Incluso se ha relacionado la disminución de sus niveles plasmáticos con la calcificación vascular, la aterosclerosis y la mortalidad por eventos cardiovasculares en pacientes en diálisis peritoneal continua [370]. Los pacientes con SCA muestran una elevación de los niveles plasmáticos de α -2-HS-Glicoproteína seis meses después del episodio agudo, lo que podría tener relación con esta posible función protectora. Asimismo, el tratamiento con Atorvastatina provoca una elevación similar a los dos meses del inicio del tratamiento, lo que podría suponer un nuevo efecto beneficioso de esta terapia. Sin embargo, el hecho de que esta elevación no esté presente en los pacientes estables, es una cuestión que deberá ser investigada.

El sistema del complemento se compone de más de 30 proteínas plasmáticas que actúan conjuntamente para generar productos con propiedades inmunoprotectoras y proinflamatorias [371]. Se trata de un sistema de defensa citotóxico e innato que normalmente funciona para eliminar agentes extraños y patógenos. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que el complemento juega un papel clave en la fisiopatología de los SCA [372]. El sistema del complemento puede ser activado por la ruta clásica, la ruta alternativa o la ruta de las lectinas [373]. La Proteína C-Reactiva se co-localiza con el complemento en las lesiones ateroscleróticas de las arterias coronarias [374] y también en el tejido cardíaco infartado durante el IAM [375]. De hecho, la Proteína C-

Reactiva y la activación del complemento son respuestas de fase aguda al daño miocárdico isquémico [376]. Es más, la Proteína C-Reactiva podría actuar como mediador proinflamatorio activando el complemento durante el AMI [377]. Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado ningún componente del complemento alterado en el momento del ingreso. Los factores B y H, ambos implicados en la ruta alternativa del complemento, presentaban alteraciones en sus niveles plasmáticos cuatro días después del episodio agudo. El primero estaba elevado y el segundo mostraba una isoforma elevada y otra disminuida, que también lo estaba a los seis meses. En cambio, el componente C3 de la ruta clásica estaba ligeramente elevado en los pacientes estables. Por último, el componente C1r presentaba una isoforma disminuida dos meses después del episodio agudo, cuyos niveles de expresión eran normalizados por el tratamiento con Atorvastatina que, en cambio, disminuía otra isoforma que no presentaba alteraciones en la terapia convencional. Estos datos muestran que el SCA modifica el sistema del complemento, pero no aclaran las consecuencias de esta modificación, que requerirán de futuras investigaciones.

La Proteína precursora de la α_1 -Microglobulina y Bikunina (AMBP) es una proteína sintetizada en el hígado que es procesada para dar lugar a dos proteínas diferentes, sin relación estructural o funcional entre sí: el Complejo Glicoproteína-HC (o α_1 -Microglobulina) y el Inhibidor de Inter- α -Tripsina (o Bikunina) [378, 379]. La AMBP puede dimerizar y su procesamiento postraduccional tiene lugar en el compartimento trans-Golgi, dando lugar a las dos proteínas maduras independientes que son liberadas al torrente sanguíneo [380]. La α_1 -Microglobulina pertenece a superfamilia de las lipocalinas [381] y parece funcionar como transportador de pequeñas moléculas hidrofóbicas, aunque también podría tener un papel importante en la regulación negativa del sistema inmune [379]. Sus niveles plasmáticos estaban elevados respecto a los controles sanos en los pacientes T=0 y también en los pacientes estables. Por su parte, el Inhibidor de Inter- α -Tripsina o Bikunina es un inhibidor de serín-proteasas de la superfamilia Kunitz y se cree que, además de participar en procesos como el crecimiento de las células endoteliales [382] o la estabilización de la matriz celular [383]. Sin embargo también parece que puede funcionar como agente anti-inflamatorio [384-386]. A diferencia de la α_1 -Microglobulina, los niveles de expresión de esta proteína en el plasma estaban disminuidos en los pacientes T=4d y T=2m respecto a los controles sanos, lo cual se podría interpretar como una

consecuencia del estado proinflamatorio que aún puede tener lugar en estos pacientes. Sin embargo, a partir de los seis meses sus niveles vuelven a la normalidad, manteniéndose sin cambios en los pacientes estables. El tratamiento con Atorvastatina es capaz de normalizar sus niveles en sólo dos meses, aunque también eleva los niveles plasmáticos de AMBP, lo que podría indicar que este fármaco actúa inhibiendo el procesamiento de esta proteína precursora.

Proteínas implicadas en el transporte de metabolitos

La Hemopexina es una proteína de 60 kDa con la mayor afinidad por el grupo Hemo que se conoce [387]. La unión extracelular de los grupos Hemo a la Hemopexina evita las propiedades fuertemente oxidativas y los efectos proinflamatorios del grupo Hemo libre, que es capaz de intercalarse en membranas celulares y otras estructuras lipofílicas como, por ejemplo, las partículas de colesterol LDL [388, 389]. Se ha sugerido que el estrés oxidativo mediado por el grupo Hemo podría influir en varios procesos inflamatorios patológicos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, el Síndrome de Distrés Respiratorio en Adultos (ARDS), la necrosis tubular aguda y la aterosclerosis [390, 391]. En nuestro estudio aparecieron varias isoformas de Hemopexina diferencialmente expresadas en el plasma de los pacientes con SCA, la mayoría de ellas elevadas respecto a los controles sanos, lo que podría suponer un mecanismo de protección contra el daño oxidativo en estos pacientes, puesto que el estrés oxidativo puede tener relación con la severidad de los SCA [392]. Sin embargo, el tratamiento con Atorvastatina normaliza los niveles de muchas de ellas y, puesto que no existen datos sobre el efecto de este fármaco en la expresión de esta proteína, esta normalización de los niveles plasmáticos de Hemopexina podría deberse a la acción antioxidante de las estatinas [393].

La Transtiretina, un biomarcador tradicional del estado nutricional e inflamatorio, tiene varias variantes moleculares cuya importancia aún se desconoce. La Transtiretina, conocida formalmente como Prealbúmina [394], pertenece a un grupo de proteínas que incluye la albúmina y se une y transporta hormonas tiroideas en la sangre [395]. Es una cadena polipeptídica de 127 aminoácidos (14 kDa) y está presente en el plasma como un tetrámero de monómeros unidos de modo no covalente. La Transtiretina también está implicada en el metabolismo de la vitamina A, ya que el tetrámero se une a la HRBP, el transportador específico para retinol en plasma [396]. La Transtiretina es sintetizada en el hígado en respuesta a aportes nutricionales, por lo que sus niveles plasmáticos pueden

ser usados como un parámetro bioquímico sensible a malnutrición subclínica [397, 398]. En cualquier caso, los niveles de Transtiretina en plasma también se ven afectados por enfermedades agudas y crónicas asociadas a la respuesta de fase aguda. En dichas condiciones, la actividad del hígado se centra en la síntesis de las proteínas de fase aguda, lo que repercute en una disminución de las proteínas sintetizadas circunstancias normales aunque exista un aporte nutricional adecuado [399]. Se han asociado alteraciones en los niveles plasmáticos de Transtiretina a diversos tipos de cáncer [400-402] y recientemente se ha propuesto un posible papel de esta proteína en el desarrollo de la aterosclerosis [403]. En el momento del ingreso detectamos un descenso en los niveles plasmáticos de una isoforma de esta proteína y un aumento casi equivalente en otra. Sin embargo, a los cuatro días estas isoformas presentaban niveles normales, mientras que otras dos isoformas diferentes estaban disminuidas. Este descenso inicial podría reflejar el estado de fase aguda del organismo, en el cual el hígado produciría menos cantidad de las proteínas que sintetiza habitualmente, como la Transtiretina [399]. En cambio, a partir de los dos meses todas las isoformas anteriores se normalizan y una isoforma nueva se eleva y permanece así incluso en los pacientes estables. Esta misma isoforma muestra unos niveles de expresión mayores en los pacientes tratados con Atorvastatina. En cambio otra isoforma diferente a todas las anteriores disminuye a los seis meses y en los pacientes estables. Se trata de nuevo de una compleja relación de isoformas que necesitará de estudios complementarios que aclaren su implicación en la evolución del SCA.

El retinol es el principal retinoide (vitamina A y sus análogos) presente en la sangre y es necesario para el desarrollo normal de diversos procesos biológicos, como el crecimiento, la respuesta inmune, la visión, etc [404]. El retinol es transportado en el plasma por una proteína transportadora específica de 21 kDa, conocida como Proteína de unión a Retinol [405]. La Proteína de unión a Retinol Humana (HRBP) se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también se expresa en otros órganos y tejidos, incluyendo el riñón, el epitelio pigmentario de la retina y el tejido adiposo [405]. El complejo retinol-HRBP viaja en el torrente circulatorio unido a la Transtiretina, evitando la filtración glomerular del retinol-HRBP en el riñón [396, 406]. Se ha comprobado que los niveles de HRBP están elevados en estados de resistencia a insulina [407]. La asociación entre los niveles elevados de HRBP y el síndrome metabólico, en relación a estados de resistencia a insulina sugiere un papel de la HRBP

en la resistencia a insulina y la diabetes de tipo 2 [408], que son factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis. En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de HRBP descenden cuatro días después del episodio agudo respecto a los controles sanos y continúan siendo bajos tras los dos primeros meses. A los seis meses la expresión de la HRBP parece volver a la normalidad, pero finalmente vuelve a estar disminuida en los pacientes estables. Además, los niveles de expresión de esta proteína en el plasma de los pacientes tratados con Atorvastatina muestran un mayor descenso que los pacientes tratados con la terapia convencional.

La Tetranectina es una lectina de tipo C homotrimérica de 67 kDa que fue identificada inicialmente debido a su afinidad específica por el plasminógeno [409, 410], aunque hoy se sabe que puede unirse a otros sustratos [411-413]. A pesar de que su función biológica aún no ha sido precisada, se sabe que la Tetranectina aumenta la activación del Plasminógeno [409]. Esta capacidad sugiere una implicación de la Tetranectina en los procesos proteolíticos y en la remodelación de tejidos en que participa la Plasmina [414]. Es más, puesto que la Plasmina juega un papel principal en la prevención de la oclusión vascular, induciendo la ruptura del coágulo [253], la Tetranectina podría tener un papel en la regulación de la fibrinólisis. Los niveles plasmáticos de una isoforma de esta proteína estaban disminuidos en nuestros pacientes cuatro días después del episodio agudo, lo que se relaciona con observaciones previas según las cuales los niveles de Tetranectina en pacientes con AMI estaban disminuidos respecto a sujetos sanos [415]. Sus niveles vuelven después a la normalidad, excepto en los pacientes estables donde se observa un nuevo descenso en la expresión de esta isoforma. Además, el tratamiento con Atorvastatina disminuye drásticamente la expresión de otra isoforma de esta proteína, lo que sugiere que la Tetranectina podría ser un mediador de los efectos fibrinolíticos de este fármaco [416]. Sin embargo, puesto que no existen datos sobre la influencia de las estatinas en la expresión de esta proteína, serán necesarios estudios complementarios para precisar esta observación.

La Proteína de unión a Vitamina D (VDBP), también conocida como Gc-globulina, es una glicoproteína multifuncional presente en plasma y otros fluidos corporales [417]. Una de sus funciones mejor conocida es el transporte de vitamina D y de sus metabolitos plasmáticos, pero sin embargo sólo una pequeña parte de la VDBP total en plasma está unida a vitamina D [417]. Además, la VDBP puede unirse a ácidos grasos, a Actina en forma monomérica y al factor del Complemento C5 [418]. Esta

última unión produce una potenciación de la actividad quimiotáctica dependiente de C5a en varios tipos celulares (monocitos y neutrófilos, fundamentalmente) [419]. Pero esta no es la única función de la VDBP en relación al sistema inmune, ya que los linfocitos T y B producen unas glicosidasas que producen la deglicosilación selectiva de esta proteína, transformándola en un factor activador de macrófagos (VDBP-MAF) [420, 421]. Por último, la capacidad de la VDBP para unirse a monómeros de Actina le permite actuar como molécula “secuestradora”, favoreciendo la eliminación y evitando la polimerización de la Actina en el plasma [422]. En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de una isoforma de esta proteína se encuentran disminuidos en todos los pacientes con SCA respecto a los controles sanos. Sin embargo, en los pacientes estables esta isoforma presenta niveles de expresión normales, mientras que aumentan los de otras dos isoformas diferentes. Además, el tratamiento con Atorvastatina normaliza los niveles de la isoforma que estaba disminuida en los pacientes tratados con la terapia convencional, aunque también disminuye la expresión de otra isoforma.

Proteínas del citoesqueleto

La β -Actina es una de las seis isoformas diferentes de Actina identificadas hasta el momento [423, 424]. Las Actinas son proteínas altamente conservadas que están implicadas en varios tipos de motilidad celular y son expresadas de un modo ubicuo en todas las células eucariotas [425]. Se sabe que la Actina circula en concentraciones micromolares en el plasma de individuos sanos, así como en la sangre de pacientes que han sufrido algún tipo de daño tisular [426, 427]. Los filamentos largos de Actina pueden aumentar la viscosidad del plasma y también pueden disparar la coagulación intravascular diseminada [428]. El plasma contiene dos proteínas de gran afinidad por la Actina (VDBP y Gelsolina) que constituyen un sistema “secuestrador” de Actina y desempeñan un papel protector, bien retirando la Actina de la circulación [429-431], bien neutralizando sus efectos angiopáticos en la microvasculatura [432]. La VDBP se une a los monómeros de Actina [422] que son liberados de los filamentos por la Gelsolina, capaz de interaccionar con ellos y acortarlos [433, 434]. Ambas proteínas, cuando están unidas a Actina, son retiradas de la circulación por el sistema reticuloendotelial mucho más rápidamente que cuando circulan libres en el plasma, lo cual produce una rápida disminución en su concentración plasmática [435]. La VDBP parece ser más eficaz en la retirada de la Actina de la circulación que la Gelsolina [429], mientras que la concentración de esta última parece ser un factor limitante en el sistema

[436]. En el momento del ingreso nuestros pacientes presentaron niveles plasmáticos de Actina elevados respecto a los controles sanos y también a los pacientes estables. Este aumento podría estar relacionado con la necrosis del miocardio, ya que a los 4 días los niveles vuelven a la normalidad. Es interesante destacar que una de las dos isoformas de Actina alteradas corresponde al valor extremo o atípico detectado en el ACP y que ambas isoformas se encuentran dentro del grupo de manchas proteicas que el análisis multivariante nos planteaba como potencial marcador.

La Gelsolina es un regulador de la polimerización de Actina dependiente de calcio, que se asocia a los filamentos de Actina y los acorta [433, 434, 437]. La Gelsolina se puede unir también a la Actina en forma monomérica y los complejos Actina-Gelsolina actúan como un núcleo para la polimerización de Actina y también puede actuar como proteína “tapón” [434, 438-441]. Como ya se ha comentado, la Gelsolina forma parte del sistema “secuestrador”, que se encarga de retirar la Actina libre en el plasma, amortiguando el efecto potencialmente dañino de esta molécula [442]. Los niveles plasmáticos bajos de Gelsolina se han asociado en humanos a varias condiciones, como trauma severo, sepsis, mionecrosis, IAM, ARDS y necrosis hepática [435, 443-447]. En nuestro estudio los niveles plasmáticos de Gelsolina descienden 4 días después del episodio agudo, lo que podría deberse a una retirada acelerada de esta proteína causada por la elevación de la Actina. Puesto que la VDBP es más eficaz que la Gelsolina en la retirada de la Actina de la circulación, sería la primera molécula del sistema “secuestrador” implicada en la retirada de la Actina liberada desde el miocardio necrótico, lo que encaja con sus niveles reducidos desde el mismo momento del ingreso. Sin embargo, la mera acción de la VDBP no sería suficiente para retirar toda la Actina de la circulación, lo que produciría una disminución secundaria de los niveles plasmáticos de ambas proteínas (que detectamos cuatro días después del evento coronario agudo). Sin embargo, los niveles plasmáticos de Gelsolina vuelven a estar disminuidos dos meses después del evento coronario y también en los pacientes estables. Además, el tratamiento con Atorvastatina no normaliza estos niveles, sino que también están disminuidos en estos pacientes. Esto hace pensar que tanto la Gelsolina como la VDBP podrían tener algún otro papel independiente del sistema “secuestrador” de Actina.

Las Tropomiosinas son una familia de proteínas estrechamente relacionadas presentes en células musculares y no musculares [448], que interaccionan

selectivamente con formas monoméricas ó multiméricas de Actina. La Tropomiosina 4 se une a filamentos de Actina y juega un papel central, en asociación con los complejos de Troponinas, en la regulación de la contracción del músculo estriado [449]. La contracción del músculo liso, por su parte, es regulada mediante la interacción con Caldesmona [450, 451]. En células no musculares, la Tropomiosina está implicada en la estabilización de los filamentos de Actina del citoesqueleto [452]. Las células del músculo liso de la pared vascular proliferan y migran a la íntima durante el proceso de aterogénesis, lo que conlleva importantes cambios morfológicos y en la expresión proteica [12, 453, 454]. Se ha visto que en esta transición entre el fenotipo contráctil y el fenotipo sintético se produce un aumento en la expresión de la TPM4 [455]. Los niveles plasmáticos de esta proteína se encontraban elevados respecto a los individuos sanos en los pacientes con SCA y también, aunque de un modo mucho más leve, en los pacientes estables. El aumento de la concentración plasmática de la TPM4 en el momento del ingreso y cuatro días después podría tener relación nuevamente con la liberación de esta proteína por parte del tejido miocárdico necrótico. Sin embargo, parece poco probable que este sea el motivo por el cual también continúa elevada en los meses posteriores. Quizás en este caso la elevación tenga relación con el proceso de estabilización de la placa, especialmente si tenemos en cuenta que la Atorvastatina es capaz de normalizar los niveles plasmáticos de esta proteína después de dos meses de tratamiento. Sin embargo se trata sólo de una hipótesis que deberá ser contrastada con nuevos estudios.

Otras funciones

La Angiotensina juega un papel principal en el control de la presión sanguínea y en la regulación del balance hidroelectrolítico. El precursor de la Angiotensina es el Angiotensinógeno, una glicoproteína de 53-65 kDa sintetizada fundamentalmente en el hígado [456]. La Renina procesa el Angiotensinógeno para dar lugar a la Angiotensina I que, por la acción de la enzima convertidora de Angiotensina, se transforma en la molécula efectora del sistema: la Angiotensina II [457]. El sistema Renina-Angiotensina funciona a nivel endocrino (sistémico o circulante) y también a nivel paracrino/autocrino (tisular o local) [458]. El primero parece ser responsable de los efectos agudos, mientras que el segundo podría participar en procesos más crónicos, contribuyendo a la patogénesis de la hipertensión y también de otras enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis y la enfermedad coronaria [459]. Además, se

ha sugerido que la región C-terminal que queda libre tras la liberación de la Angiotensina I podría tener un papel en la inhibición de la angiogénesis [460]. La disminución de los niveles plasmáticos de varias isoformas de Angiotensinógeno detectada dos meses después del episodio agudo en los pacientes que recibieron el tratamiento convencional se veía normalizada en los pacientes que fueron tratados con Atorvastatina. Este hecho podría tener relación con un posible efecto de esta medicación sobre la presión sanguínea [461, 462]. Sin embargo, serían necesarios estudios complementarios para investigar si este efecto podría deberse a un cambio en el procesamiento del Angiotensinógeno.

El Antígeno Hakata, también conocido como H-Ficolina, es una glicoproteína de 35 kDa que se encuentra en el plasma en forma multimérica [463]. Su estructura primaria conserva las características de la familia de las Ficolinas [464], con un dominio similar al Fibrinógeno y otro similar al Colágeno y se ha comprobado que también mantiene la actividad lectina, por lo que es capaz de provocar la activación del complemento [465]. Además, se ha comprobado que esta proteína interviene en la eliminación de las células en estado apoptótico avanzado [466]. La disminución de la expresión de esta proteína en el plasma de los pacientes estables podría tener relación con un control del estado inflamatorio mediante una regulación negativa del sistema del complemento. Sin embargo, como en el caso de la Ficolina diferencialmente expresada en los monocitos circulantes, al no existir datos sobre el efecto de las estatinas en la regulación de la expresión de las proteínas de esta familia en el SCA, estos resultados requieren nuevos estudios que ayuden a esclarecer este posible efecto.

La Triosafosfato Isomerasa es una enzima homodimérica formada por dos subunidades de 27 kDa [467] que es esencial para la producción eficaz de energía. Esta enzima juega un papel importante en varias rutas metabólicas y sólo es activa en su forma dimérica. Cataliza la interconversión entre D-gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato y una reducción de su actividad se ha relacionado con la aparición de diversas enfermedades [468, 469]. Como se había comentado previamente, en un modelo animal con monos se vio que la expresión de la Triosafosfato isomerasa está disminuida en el ventrículo izquierdo de los machos viejos, lo que podría estar relacionado con el aumento en la incidencia de eventos cardiovasculares en los monos de mayor edad [231]. Al contrario de lo que ocurría en los monocitos circulantes, los niveles plasmáticos de Triosafosfato isomerasa están elevados en los pacientes con SCA

(excepto cuatro días después del ingreso), aunque no en los pacientes estables. En cambio, al igual que ocurría en el caso de los monocitos, el tratamiento con Atorvastatina normaliza los niveles de esta proteína en el plasma. Esto sugiere la que los monocitos podrían liberar de algún modo esta enzima en el plasma de los pacientes con SCA. Sin embargo, serán necesarios nuevos estudios para poder confirmar esta posibilidad.

En general, el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional de monocitos circulantes y plasma de pacientes con SCA nos ha permitido encontrar varias proteínas diferencialmente expresadas en relación a esta patología. En el caso de los monocitos circulantes hemos comprobado que, tomando como referencia el proteoma de los individuos sanos, el perfil proteico con mayor número de alteraciones se asocia al inicio del evento coronario agudo. Dicho perfil, en el transcurso de la evolución de los pacientes, tiende a parecerse de nuevo al de los individuos sanos, aunque nunca llega a ser idéntico, siendo el perfil de los pacientes después de seis meses el mismo que el de los pacientes estables. Sin embargo, este patrón de evolución no se repite en el caso del proteoma plasmático, cuyo perfil de expresión en el momento del ingreso se parece más al de los individuos sanos que al de los pacientes estables. Este hecho se debe probablemente a la diferente naturaleza de ambas muestras, ya que los monocitos son un tipo celular relativamente homogéneo que regula la expresión de sus propias proteínas y responde ante los estímulos que recibe de un modo uniforme. En cambio, el plasma no es un tipo celular, ni un tejido capaz de controlar la expresión de sus proteínas, sino que se trata de un fluido que recoge lo que diferentes células, tejidos y órganos liberan en él. En un individuo que está siendo medicado, el plasma no sólo va a recibir proteínas procedentes de los tejidos y órganos diana del tratamiento, sino también del resto de órganos y tejidos en los que el fármaco puede ejercer otros efectos. Además, muchas de las proteínas “típicas” del plasma, que son sintetizadas en el hígado, funcionan como transportadores de metabolitos en la sangre y sus niveles también pueden verse alterados por una medicación crónica. Por otra parte, en el caso de los SCA, los tratamientos deben de controlar y limitar la respuesta inflamatoria y, por tanto, deben afectar a las proteínas relacionadas con dicha respuesta, siendo muchas de ellas proteínas plasmáticas. Todos estos factores influyen el proteoma del plasma de los pacientes estables, que llevan recibiendo tratamiento durante más de un año.

Discusión

En definitiva, la presente tesis doctoral muestra que el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional combinada con espectrometría de masas es una herramienta útil en el estudio de la expresión proteica en la sangre de pacientes con SCA. Los datos presentados abren la puerta a futuros estudios para tratar de averiguar si estas variaciones desempeñan algún papel en la fisiopatología de la aterotrombosis, o bien para evaluar su posible utilidad como biomarcadores pronósticos y/o de evolución de la enfermedad.

Conclusiones

Una conclusión es el lugar donde llegaste cansado de pensar.

Anónimo

- 1) Los monocitos circulantes de pacientes con SCA presentan un perfil de expresión característico. Los mapas proteicos bidimensionales presentan 25 proteínas con alteraciones estadísticamente significativas en sus niveles de expresión en el momento del episodio agudo, respecto al perfil mostrado por los monocitos de individuos sanos. El número de alteraciones se reduce progresivamente en el tiempo, estabilizándose seis meses después del SCA en 5 proteínas. El perfil de expresión de los monocitos circulantes en ese momento es semejante al de los pacientes estables.
- 2) El tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d durante los dos meses siguientes al SCA modifica la expresión de 27 proteínas respecto al tratamiento convencional en los monocitos circulantes.
- 3) La depleción de las proteínas mayoritarias del plasma humano utilizando un sistema cromatográfico de inmunoafinidad múltiple es un método eficaz y reproducible que permite estudiar la expresión de las proteínas menos abundantes del plasma mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE) y electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE).
- 4) El análisis mediante 2-DE del plasma deplecionado de los pacientes con SCA muestra en total 52 proteínas diferencialmente expresadas respecto a los individuos sanos. Al contrario que en el caso de los monocitos circulantes, el perfil de expresión en el momento del ingreso es más parecido al de los individuos sanos que al de los pacientes estables.
- 5) El análisis mediante 2D-DIGE del plasma deplecionado de los pacientes con SCA muestra en total 49 proteínas diferencialmente expresadas respecto a los individuos

Conclusiones

sanos. El perfil de expresión en el momento del ingreso es también en este caso más parecido al de los individuos sanos que al de los pacientes estables.

- 6) La expresión de 17 proteínas se ve modificada por el tratamiento con Atorvastatina 80 mg/d durante los dos meses siguientes al SCA en el análisis mediante 2-DE. El análisis mediante 2D-DIGE muestra variaciones producidas por el mismo tratamiento en 33 proteínas.
- 7) Las 25 proteínas diferencialmente expresadas en los monocitos circulantes de los pacientes con SCA en el momento del episodio agudo han sido identificadas y corresponden a isoformas de 20 proteínas diferentes entre las que se encuentran varias proteínas del metabolismo energético, proteínas de estrés y contráctiles, enzimas hidrolíticas y algunas proteínas implicadas en procesos de inflamación y trombosis.
- 8) En conjunto, los datos obtenidos mediante ambas técnicas de electroforesis bidimensional (2-DE y 2D-DIGE) revelan la existencia de 113 proteínas diferencialmente expresadas en el plasma deplecionado de los pacientes con SCA. De ellas, 103 han sido identificadas, correspondiendo a isoformas de 35 proteínas implicadas en varios procesos fisiológicos, tales como la coagulación, la inflamación y respuesta inmune, el metabolismo y transporte de lípidos y el transporte de otros metabolitos en la sangre.
- 9) Las proteínas cuya expresión se ve afectada por el tratamiento con Atorvastatina 80mg/d en los monocitos circulantes corresponden a isoformas de 20 proteínas diferentes.
- 10) Las proteínas cuya expresión se ve afectada por el tratamiento con Atorvastatina 80mg/d en el plasma deplecionado corresponden a isoformas de 22 proteínas diferentes.
- 11) En conjunto, los datos presentados en esta Tesis Doctoral muestran que el análisis proteómico de los elementos de la sangre (plasma y monocitos circulantes) de los pacientes con SCA permite identificar nuevas proteínas con alteraciones en sus niveles de expresión que las convierten en candidatas a biomarcadores de la enfermedad. Además, estos resultados permiten plantear nuevas líneas de investigación para estudiar la posible implicación de las proteínas identificadas en la fisiopatología de la aterotrombosis.

Bibliografía

Algunos libros son probados, otros devorados, poquísimos masticados y digeridos.

Francis Bacon

Hay que tener cuidado con los libros de salud;
podemos morir por culpa de una errata.

Mark Twain

1. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326:242-50.
2. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;326:310-8.
3. Falk E, Shah PK, Fuster V. Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. New York: Raven Press, 1996.
4. Falk E, Shah PK. Pathogenesis of Atherothrombosis. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, eds. *Atherothrombosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
5. Toschi V, Gallo R, Lettino M, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997;95:594-9.
6. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1562-9.
7. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
8. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-8.
9. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1269-76.
10. Villar F. BJRdMJRF. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Madrid: Ergon, 2003.
11. Parmet S, Glass TJ, Glass RM. JAMA patient page. Coronary artery disease. *JAMA* 2004;292:2540.
12. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
13. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
14. Verrier ED, Boyle EM, Jr. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 1996;62:915-22.
15. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:631-8.
16. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-41.
17. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.

18. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417:750-4.
19. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8:1235-42.
20. Barderas MG, Gallego-Delgado J, Durán MC, et al. Análisis proteómico de monocitos circulantes humanos. Aplicación a pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación Cardiovascular* 2004;7:1-18.
21. Gonzalez-Barderas M, Gallego-Delgado J, Mas S, et al. Isolation of circulating human monocytes with high purity for proteomic analysis. *Proteomics* 2004;4:432-7.
22. Davies MJ. Going from immutable to mutable atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol* 2001;88:2F-9F.
23. Tremoli E, Camera M, Maderna P, et al. Increased synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 by cultured human endothelial cells exposed to native and modified LDLs. An LDL receptor-independent phenomenon. *Arterioscler Thromb* 1993;13:338-46.
24. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-503.
25. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348-53.
26. Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Luderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999;41:480-8.
27. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
28. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992;14:455-63.
29. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94:2013-20.
30. Wood D, De BG, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Pyorala K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. *Atherosclerosis* 1998;140:199-270.
31. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction-Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) Developed in Collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:652-726.
32. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1999 guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol* 2004;44:671-719.
33. Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E. Acute coronary syndrome without ST elevation: implementation of new guidelines. *Lancet* 2001;358:1533-8.
34. Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003;361:847-58.
35. Wiviott SD, Braunwald E. Unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: part II. Coronary revascularization, hospital discharge, and post-hospital care. *Am Fam Physician* 2004;70:535-8.
36. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1988;2:349-60.
37. Clarke RJ, Mayo G, FitzGerald GA, Fitzgerald DJ. Combined administration of aspirin and a specific thrombin inhibitor in man. *Circulation* 1991;83:1510-8.
38. Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ* 1999;318:1730-7.
39. Freemantle N, Urdahl H, Eastaugh J, Hobbs FD. What is the place of beta-blockade in patients who have experienced a myocardial infarction with preserved left ventricular function? Evidence and (mis)interpretation. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;44:243-50.

40. Latini R, Tognoni G, Maggioni AP, et al. Clinical effects of early angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment for acute myocardial infarction are similar in the presence and absence of aspirin: systematic overview of individual data from 96,712 randomized patients. Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1801-7.
41. Flather MD, Yusuf S, Kober L, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 2000;355:1575-81.
42. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, et al. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl* 2004;5:81-7.
43. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
44. Brown BG, Gotto AM. Impact of management on stabilization of plaque and reduction of cardiovascular events. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, eds. *Atherothrombosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
45. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:1071-80.
46. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20-8.
47. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004;350:1495-504.
48. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, III, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med* 2006;355:549-59.
49. Vivanco F, Martin-Ventura JL, Duran MC, et al. Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Proteome Res* 2005;4:1181-91.
50. Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:C19-C31.
51. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006;113:2335-62.
52. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
53. Vivanco F, Padial LR, Darde VM, et al. Proteomic biomarkers of atherosclerosis. *Biomarkers Insights* 2007;(en revisión).
54. Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, et al. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res* 2003;57:168-77.
55. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001;89:763-71.
56. Koenig W, Sund M, Frohlich M, et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237-42.
57. Garlicks CD, Eskafi S, Raaz D, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001;86:649-55.
58. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-11.
59. Ritchie ME. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998;98:1707-13.
60. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:690-5.
61. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:1387-97.
62. Duran MC, Mas S, Martin-Ventura JL, et al. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics* 2003;3:973-8.
63. Duran MC, Martin-Ventura JL, Mas S, et al. Characterization of the human atheroma plaque secretome by proteomic analysis. *Methods Mol Biol* 2007;357:141-50.
64. Duran MC, Martin-Ventura JL, Mohammed S, et al. Atorvastatin modulates the profile of proteins released by human atherosclerotic plaques. *Eur J Pharmacol* 2007;562:119-29.

65. Barderas MG, Duran MC, Darde VM, et al. Expresión diferencial de proteínas de monocitos circulantes en el síndrome coronario agudo mediante análisis proteómico. *Investigación Cardiovascular* 2005;8:43-56.
66. Barderas MG, Tunon J, Darde VM, et al. Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile. *J Proteome Res* 2007;6:876-86.
67. Barderas MG, Darde VM, Duran MC, Egido J, Vivanco F. Characterization of circulating human monocytes by proteomic analysis. *Methods Mol Biol* 2007;357:319-28.
68. Darde VM, Barderas MG, De la Cuesta F, Durán MC, Egido J, Vivanco F. La depleción de las proteínas mayoritarias del plasma facilita su análisis proteómico en pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación Cardiovascular* 2006;9:37-54.
69. Arab S, Gramolini AO, Ping P, et al. Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1733-41.
70. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:845-67.
71. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-7.
72. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-46.
73. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003;422:193-7.
74. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001;70:437-73.
75. Archakov AI, Ivanov YD, Lisitsa AV, Zgoda VG. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics* 2007;7:4-9.
76. Medzihradszky KF, Leffler H, Baldwin MA, Burlingame AL. Protein identification by in-gel digestion, high-performance liquid chromatography, and mass spectrometry: peptide analysis by complementary ionization techniques. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001;12:215-21.
77. Pieper R, Gatlin CL, Makusky AJ, et al. The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* 2003;3:1345-64.
78. Badock V, Steinhusen U, Bommert K, Otto A. Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis* 2001;22:2856-64.
79. Ardrey RE, NetLibrary I. *Liquid chromatography-mass spectrometry an introduction*. West Sussex, England: J. Wiley, 2003.
80. Issaq HJ. The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis* 2001;22:3629-38.
81. Lesley SA. High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein Expr Purif* 2001;22:159-64.
82. Griffin TJ, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *J Biol Chem* 2001;276:45497-500.
83. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1999;17:676-82.
84. Washburn MP, Ulaszek R, Deciu C, Schieltz DM, Yates JR, III. Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Anal Chem* 2002;74:1650-7.
85. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR, III. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 2001;73:5683-90.
86. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4:242-50.
87. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999;17:994-9.
88. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 2007;7:340-50.
89. Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC. Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res* 2007;6:821-7.
90. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-53.
91. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9390-5.
92. Kenrick KG, Margolis J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem* 1970;33:204-7.

93. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26:231-43.
94. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
95. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982;6:317-39.
96. Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;9:531-46.
97. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 2005;382:669-78.
98. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003;422:198-207.
99. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
100. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
101. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 2001;101:269-95.
102. McLuckey SA, Van Berkel GJ, Goeringer DE, Glish GL. Ion trap mass spectrometry. Using high-pressure ionization. *Anal Chem* 1994;66:737A-43A.
103. Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem* 1992;64:1027A-39A.
104. Medzihradszky KF, Campbell JM, Baldwin MA, et al. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* 2000;72:552-8.
105. Shevchenko A, Loboda A, Shevchenko A, Ens W, Standing KG. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal Chem* 2000;72:2132-41.
106. Le Blanc JC, Hager JW, Ilisiu AM, Hunter C, Zhong F, Chu I. Unique scanning capabilities of a new hybrid linear ion trap mass spectrometer (Q TRAP) used for high sensitivity proteomics applications. *Proteomics* 2003;3:859-69.
107. Comisarow MB, Marshall AG. The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy. *J Mass Spectrom* 1996;31:581-5.
108. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev* 1998;17:1-35.
109. Marshall AG, Hendrickson CL, Emmett MR, Rodgers RP, Blakney GT, Nilsson CL. Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 2007;13:57-9.
110. Issaq HJ, Conrads TP, Prieto DA, Tirumalai R, Veenstra TD. SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Anal Chem* 2003;75:148A-55A.
111. Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:1164-77.
112. Clauser KR, Baker P, Burlingame AL. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* 1999;71:2871-82.
113. James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G. Protein identification in DNA databases by peptide mass fingerprinting. *Protein Sci* 1994;3:1347-50.
114. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993;3:327-32.
115. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20:3551-67.
116. Zhang W, Chait BT. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 2000;72:2482-9.
117. Biemann K, Scoble HA. Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. *Science* 1987;237:992-8.
118. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001;36:849-65.
119. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14440-5.
120. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1988;16:99-111.

121. Clauser KR, Hall SC, Smith DM, et al. Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5072-6.
122. Anderson L, Anderson NG. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5421-5.
123. Celis JE, Rasmussen HH, Gromov P, et al. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways. *Electrophoresis* 1995;16:2177-240.
124. Righetti PG, Campostrini N, Pascali J, Hamdan M, Astner H. Quantitative proteomics: a review of different methodologies. *Eur J Mass Spectrom* (Chichester, Eng) 2004;10:335-48.
125. Westermeier R, Marouga R. Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* 2005;25:19-32.
126. Gallego-Delgado J, Lazaro A, Osende JJ, et al. Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *J Proteome Res* 2006;5:404-13.
127. Lazaro A, Gallego-Delgado J, Osende JJ, Egido J, Vivanco F. Analysis of antihypertensive drugs in the heart of animal models: a proteomic approach. *Methods Mol Biol* 2007;357:45-58.
128. Alfonso P, Nunez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sanchez L, Casal JJ. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 2005;5:2602-11.
129. Huang HL, Stasyk T, Morandell S, et al. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis* 2006;27:1641-50.
130. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003;21:255-61.
131. Uy R, Wold F. Posttranslational covalent modification of proteins. *Science* 1977;198:890-6.
132. Duran MC, Boeri-Erba E, Mohammed S, et al. Characterization of HSP27 phosphorylation sites in human atherosclerotic plaque secretome. *Methods Mol Biol* 2007;357:151-63.
133. Figeys D. Functional proteomics: mapping protein-protein interactions and pathways. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4:210-5.
134. Figeys D. Novel approaches to map protein interactions. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:119-25.
135. Yanagida M. Functional proteomics; current achievements. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;771:89-106.
136. Buey RM, Calvo E, Barasoain I, et al. Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nat Chem Biol* 2007;3:117-25.
137. Rix U, Hantschel O, Durnberger G, et al. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib reveal novel kinase and non-kinase targets. *Blood* 2007.
138. Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, et al. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 2007;25:1035-44.
139. Abdul-Salam VB, Paul GA, Ali JO, et al. Identification of plasma protein biomarkers associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proteomics* 2006;6:2286-94.
140. Chaurand P, Norris JL, Cornett DS, Mobley JA, Caprioli RM. New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res* 2006;5:2889-900.
141. Meistermann H, Norris JL, Aerni HR, et al. Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1876-86.
142. Chaurand P, Caprioli RM. Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2002;23:3125-35.
143. Chaurand P, Schwartz SA, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:676-81.
144. Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 1996;17:813-29.
145. Englard S, Seifter S. Precipitation techniques. *Methods Enzymol* 1990;182:285-300.
146. Salvesen G, Nagase H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: Beynon RJ, Bond JS, eds. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1989.
147. Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1988;9:712-8.
148. Sanchez JC, Rouge V, Pisteur M, et al. Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry

- immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1997;18:324-7.
149. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
150. Gorg A, Postel W, Weser J, et al. Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 1987;8:122-4.
151. Rabilloud T. Proteome research, two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. Berlin etc.: Springer-Verlag, 2000.
152. Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* 2000;21:1123-44.
153. Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003;3:1567-96.
154. Palagi PM, Hernandez P, Walther D, Appel RD. Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics* 2006;6:5435-44.
155. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004;4:3665-85.
156. Karas M, Gluckmann M, Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* 2000;35:1-12.
157. Hoffman E, Stroobant V. Time of flight analyzers. In: Hoffman E, Stroobant V, eds. *Mass Spectrometry. Principles and applications.*, 2nd Edn. New York: Wiley, 2003.
158. Van Eyk JE. Proteomics: unraveling the complexity of heart disease and striving to change cardiology. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:546-53.
159. Van Eyk JE, Dunn MJ. Proteomic and genomic analysis of cardiovascular disease. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
160. Zerkowski HR, Grussenmeyer T, Matt P, Grapow M, Engelhardt S, Lefkovits I. Proteomics strategies in cardiovascular research. *J Proteome Res* 2004;3:200-8.
161. McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of heart disease. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:R135-R144.
162. Jungblut P, Otto A, Regitz V, Fleck E, Wittmann-Liebold B. Identification of human myocard proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1992;13:739-41.
163. Baker CS, Corbett JM, May AJ, Yacoub MH, Dunn MJ. A human myocardial two-dimensional electrophoresis database: protein characterisation by microsequencing and immunoblotting. *Electrophoresis* 1992;13:723-6.
164. Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, et al. Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. *Electrophoresis* 1994;15:685-707.
165. Stastny J, Fosslien E, Robertson AL, Jr. Human aortic intima protein composition during initial stages of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1986;60:131-9.
166. You SA, Archacki SR, Angheloiu G, et al. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics* 2003;13:25-30.
167. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Western array analysis of human atherosclerotic plaques: downregulation of apoptosis-linked gene 2. *Cardiovasc Res* 2003;60:259-67.
168. Lo KW, Zhang Q, Li M, Zhang M. Apoptosis-linked gene product ALG-2 is a new member of the calpain small subunit subfamily of Ca²⁺-binding proteins. *Biochemistry* 1999;38:7498-508.
169. Mayr M, Chung YL, Mayr U, et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2135-42.
170. Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:2216-9.
171. De CR. Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:453-67.
172. Blann AD. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:256-61.
173. Kinumi T, Ogawa Y, Kimata J, Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by exposure to oxidized LDL. *Free Radic Res* 2005;39:1335-44.
174. Patton WF, Erdjument-Bromage H, Marks AR, Tempst P, Taubman MB. Components of the protein synthesis and folding machinery are induced in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic agents. Identification by comparative protein

- phenotyping and microsequencing. *J Biol Chem* 1995;270:21404-10.
175. McGregor E, Kempster L, Wait R, Gosling M, Dunn MJ, Powell JT. F-actin capping (CapZ) and other contractile saphenous vein smooth muscle proteins are altered by hemodynamic stress: a proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:115-24.
176. Pellieux C, Desgeorges A, Pigeon CH, et al. Cap G, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress. *J Biol Chem* 2003;278:29136-44.
177. Tuomisto TT, Riekkinen MS, Viita H, Levonen AL, Yla-Herttuala S. Analysis of gene and protein expression during monocyte-macrophage differentiation and cholesterol loading--cDNA and protein array study. *Atherosclerosis* 2005;180:283-91.
178. Tuomisto TT, Binder BR, Yla-Herttuala S. Genetics, genomics and proteomics in atherosclerosis research. *Ann Med* 2005;37:323-32.
179. Kang JH, Kim HT, Choi MS, et al. Proteome analysis of human monocytic THP-1 cells primed with oxidized low-density lipoproteins. *Proteomics* 2006;6:1261-73.
180. Fach EM, Garulacan LA, Gao J, et al. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:1200-10.
181. Vivanco F, Mas S, Darde VM, De la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Barderas MG. Vascular proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:1102-22.
182. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1981;103:191-200.
183. Pataki M, Lusztig G, Robenek H. Endocytosis of oxidized LDL and reversibility of migration inhibition in macrophage-derived foam cells in vitro. A mechanism for atherosclerosis regression? *Arterioscler Thromb* 1992;12:936-44.
184. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
185. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003;83:1069-112.
186. Weston AD, Hood L. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res* 2004;3:179-96.
187. Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:1096-103.
188. Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:409-18.
189. Paoletti AC, Zybaylov B, Washburn MP. Principles and applications of multidimensional protein identification technology. *Expert Rev Proteomics* 2004;1:275-82.
190. Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, et al. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18928-33.
191. Kislinger T, Gramolini AO, MacLennan DH, Emili A. Multidimensional protein identification technology (MudPIT): technical overview of a profiling method optimized for the comprehensive proteomic investigation of normal and diseased heart tissue. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005;16:1207-20.
192. Yang Z, Hancock WS. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *J Chromatogr A* 2004;1053:79-88.
193. Marshall J, Jankowski A, Furesz S, et al. Human serum proteins pre-separated by electrophoresis or chromatography followed by tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2004;3:364-82.
194. Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, et al. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *J Proteome Res* 2004;3:1120-7.
195. Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* 2005;5:307-17.
196. Pieper R, Su Q, Gatlin CL, Huang ST, Anderson NL, Steiner S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics* 2003;3:422-32.
197. Wheatley JB. Multiple ligand applications in high-performance immunoaffinity chromatography. *J Chromatogr* 1992;603:273-8.
198. Phillips TM, Krum JM. Recycling immunoaffinity chromatography for multiple analyte analysis in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;715:55-63.

199. Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 1982;257:10766-9.
200. Kim HO, Durance TD, Li-Chan EC. Reusability of avidin-biotinylated immunoglobulin Y columns in immunoaffinity chromatography. *Anal Biochem* 1999;268:383-97.
201. Darde VM, Barderas MG, Vivanco F. Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis. *Methods Mol Biol* 2007;357:351-64.
202. John Wiley & Sons. *Current Protocols in Molecular Biology*, **10.1.4. Supplement 35**. Edn 2001.
203. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 85 A.D.;6:103-12.
204. Jackson JE. *A User's guide to principal components*. New York: Wiley, 1991.
205. Abraira V, Alberto Pérez de Vargas. *Métodos Multivariantes en Bioestadística*. Madrid: Editorial Centro de Estudios Ramón Areces, 1996.
206. Everitt B. *Cluster analysis*. New York: Wiley, 1974.
207. Kaufman L, Rousseeuw PJ. *Finding groups in data an introduction to cluster analysis*. New York: Wiley, 1990.
208. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850-8.
209. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003;376:952-65.
210. Lefkovits I, Kettman JR, Frey JR. Global analysis of gene expression in cells of the immune system I. Analytical limitations in obtaining sequence information on polypeptides in two-dimensional gel spots. *Electrophoresis* 2000;21:2688-93.
211. Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:408-12.
212. Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, et al. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:947-55.
213. Wagner Y, Sickmann A, Meyer HE, Daum G. Multidimensional nano-HPLC for analysis of protein complexes. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003;14:1003-11.
214. Bodnar WM, Blackburn RK, Krise JM, Moseley MA. Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003;14:971-9.
215. Fenyo D. Identifying the proteome: software tools. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:391-5.
216. Blanco-Colio LM, Tunon J, Martin-Ventura JL, Egido J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int* 2003;63:12-23.
217. Barderas MG, Tuñón J, Darde VM, et al. Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics Clin Appl* 2007;(en revisión).
218. Lopez MF, Melov S. Applied proteomics: mitochondrial proteins and effect on function. *Circ Res* 2002;90:380-9.
219. Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 1994;19:331-6.
220. Higuchi T, Watanabe Y, Waga I. Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:46-52.
221. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71.
222. Wilson SH, Best PJ, Edwards WD, et al. Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2002;160:147-53.
223. Cominacini L, Anselmi M, Garbin U, et al. Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:799-806.
224. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gomez-Hernandez A, et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke* 2005;36:1796-800.
225. Bottalico LA, Kendrick NC, Keller A, Li Y, Tabas I. Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in

- an alpha-enolase isoform. *Arterioscler Thromb* 1993;13:264-75.
226. Yang Y, Yang Y, Trent MB, et al. Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;173:211-21.
227. Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005;3:465-72.
228. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, et al. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004;35:458-63.
229. Cao Z, Li Y. Chemical induction of cellular antioxidants affords marked protection against oxidative injury in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:50-7.
230. Doney AS, Lee S, Leese GP, Morris AD, Palmer CN. Increased cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes is associated with the glutathione S transferase theta-null genotype: a Go-DARTS study. *Circulation* 2005;111:2927-34.
231. Yan L, Ge H, Li H, et al. Gender-specific proteomic alterations in glycolytic and mitochondrial pathways in aging monkey hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:921-9.
232. Yonezawa S, Takahashi T, Wang XJ, Wong RN, Hartsuck JA, Tang J. Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. *J Biol Chem* 1988;263:16504-11.
233. Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, et al. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1430-6.
234. Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1124-30.
235. Verhoeckx KC, Bijlsma S, de Groene EM, Witkamp RF, van der GJ, Rodenburg RJ. A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line. *Proteomics* 2004;4:1014-28.
236. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-80.
237. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;101:2252-7.
238. Depre C, Wang L, Sui X, et al. H11 kinase prevents myocardial infarction by preemptive preconditioning of the heart. *Circ Res* 2006;98:280-8.
239. Fuhrman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis* 2002;164:179-85.
240. Paragh G, Torocsik D, Seres I, et al. Effect of short term treatment with simvastatin and atorvastatin on lipids and paraonase activity in patients with hyperlipoproteinaemia. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1321-7.
241. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, et al. Effect of simvastatin therapy on paraonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113-9.
242. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1055-9.
243. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999;103:571-7.
244. Uchiyama T, Atsuta H, Utsugi T, et al. Simvastatin induces heat shock factor 1 in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2006;188:265-73.
245. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 1998;98:300-7.
246. Xiao Q, Mandal K, Schett G, et al. Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Stroke* 2005;36:2571-6.
247. Shamaei-Tousi A, Stephens JW, Bin R, et al. Association between plasma levels of heat shock protein 60 and cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J* 2006;27:1565-70.
248. Ghayour-Mobarhan M, Lamb DJ, Vaidya N, Livingstone C, Wang T, Ferns GA. Heat shock protein antibody titers are reduced by statin therapy in dyslipidemic subjects: a pilot study. *Angiology* 2005;56:61-8.
249. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by

- inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 2004;11:390-402.
250. Roviezzo F, Getting SJ, Paul-Clark MJ, et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:541-53.
251. Zouki C, Ouellet S, Filep JG. The anti-inflammatory peptides, antilammins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells. *FASEB J* 2000;14:572-80.
252. Hwang J, Hodis HN, Hsiai TK, Asatryan L, Sevanian A. Role of annexin II in estrogen-induced macrophage matrix metalloproteinase-9 activity: the modulating effect of statins. *Atherosclerosis* 2006;189:76-82.
253. Ogston D. Biochemistry of the plasmin system. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1980;14:5-9.
254. Ishii H, Yoshida M, Hiraoka M, et al. Recombinant annexin II modulates impaired fibrinolytic activity in vitro and in rat carotid artery. *Circ Res* 2001;89:1240-5.
255. Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:128-38.
256. Kawabata S, Tsuda R. Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:414-21.
257. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:346-53.
258. Heidenthal AK, Weber PC, Lottspeich F, Hrboticky N. The binding in vitro of modified LDL to the intermediate filament protein vimentin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:49-53.
259. Qin H, Ishiwata T, Wang R, et al. Effects of extracellular matrix on phenotype modulation and MAPK transduction of rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Exp Mol Pathol* 2000;69:79-90.
260. Iancu-Rubin C, Atweh GF. p27(Kip1) and stathmin share the stage for the first time. *Trends Cell Biol* 2005;15:346-8.
261. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004;93:242-50.
262. Li W, Tanaka K, Morioka K, et al. Thymidine phosphorylase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1 and p27KIP1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1370-5.
263. Liekens S, Bronckaers A, Hernandez AI, et al. 5'-O-tritylated nucleoside derivatives: inhibition of thymidine phosphorylase and angiogenesis. *Mol Pharmacol* 2006;70:501-9.
264. Westaby S, Johnsson P, Parry AJ, et al. Serum S100 protein: a potential marker for cerebral events during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996;61:88-92.
265. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The RAGE axis and endothelial dysfunction: maladaptive roles in the diabetic vasculature and beyond. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:237-43.
266. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* 1997;272:9496-502.
267. Passey RJ, Xu K, Hume DA, Geczy CL. S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol* 1999;66:549-56.
268. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, et al. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem* 2005;280:41521-9.
269. Tang Y, Xu H, Du X, et al. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1089-102.
270. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2005;80:349-74.
271. Nijtmans LG, de JL, Artal SM, et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J* 2000;19:2444-51.
272. Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, Murphy LJ. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* 2005;11:192-7.
273. Tonge R, Shaw J, Middleton B, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 2001;1:377-96.
274. Von EF, Gawriljuk A, Fiedler W, et al. Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein pattern with standard image analysis software. *Int J Mol Med* 2001;8:373-7.
275. Yan JX, Devenish AT, Wait R, Stone T, Lewis S, Fowler S. Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis

- of *Escherichia coli*. *Proteomics* 2002;2:1682-98.
276. Alban A, David SO, Bjorkestén L, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003;3:36-44.
277. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:29-38.
278. Berhane BT, Zong C, Liem DA, et al. Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO Plasma Proteome Project pilot phase. *Proteomics* 2005;5:3520-30.
279. Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol* 2005;563:23-60.
280. Kruskal JB, Commerford PJ, Franks JJ, Kirsch RE. Fibrin and fibrinogen-related antigens in patients with stable and unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 1987;317:1361-5.
281. Neumann FJ, Katus HA, Hoberg E, et al. Increased plasma viscosity and erythrocyte aggregation: indicators of an unfavourable clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Br Heart J* 1991;66:425-30.
282. Meade TW, Vickers MV, Thompson SG, Seghatchian MJ. The effect of physiological levels of fibrinogen on platelet aggregation. *Thromb Res* 1985;38:527-34.
283. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1984;311:501-5.
284. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 1987;258:1183-6.
285. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 1991;83:836-44.
286. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-63.
287. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;294:1799-809.
288. Abdelmouttaleb I, Danchin N, Ilardo C, et al. C-Reactive protein and coronary artery disease: additional evidence of the implication of an inflammatory process in acute coronary syndromes. *Am Heart J* 1999;137:346-51.
289. Abrignani MG, Novo G, Di GA, et al. Increased plasma levels of fibrinogen in acute and chronic ischemic coronary syndromes. *Cardiologia* 1999;44:1047-52.
290. Arnau Vives MA, Rueda SJ, Martínez Dolz LV, et al. Prognostic value of fibrinogen in patients admitted with suspected unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:622-30.
291. Becker RC, Cannon CP, Bovill EG, et al. Prognostic value of plasma fibrinogen concentration in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction (TIMI IIIB Trial). *Am J Cardiol* 1996;78:142-7.
292. McNally T, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. Elevated levels of beta 2 glycoprotein-I (beta 2 GPI) in antiphospholipid antibody syndrome are due to increased amounts of beta 2 GPI in association with other plasma constituents. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:411-6.
293. Schousboe I. beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985;66:1086-91.
294. Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti-beta-2 glycoprotein I autoantibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2002;119:781-8.
295. Sheng Y, Reddel SW, Herzog H, et al. Impaired thrombin generation in beta 2-glycoprotein I null mice. *J Biol Chem* 2001;276:13817-21.
296. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease. *Thromb Res* 2004;114:335-46.
297. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, et al. Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 2004;103:3766-72.
298. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 1997;107:569-73.
299. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997;90:3819-43.
300. Isordia-Salas I, Sainz IM, Pixley RA, Martínez-Murillo C, Colman RW. High

- molecular weight kininogen in inflammation and angiogenesis: a review of its properties and therapeutic applications. *Rev Invest Clin* 2005;57:802-13.
301. Asakura S, Hurley RW, Skorstengaard K, Ohkubo I, Mosher DF. Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen. *J Cell Biol* 1992;116:465-76.
302. Chavakis T, Boeckel N, Santoso S, et al. Inhibition of platelet adhesion and aggregation by a defined region (Gly-486-Lys-502) of high molecular weight kininogen. *J Biol Chem* 2002;277:23157-64.
303. Chan DC, Watts GF. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *QJM* 2006;99:277-87.
304. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996;94:713-7.
305. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, et al. Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1987;68:35-40.
306. Ramet ME, Ramet M, Lu Q, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2288-97.
307. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:2292-300.
308. Alaupovic P, Heinonen T, Shurzinske L, Black DM. Effect of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on lipids, apolipoproteins and lipoprotein particles in patients with elevated serum cholesterol and triglyceride levels. *Atherosclerosis* 1997;133:123-33.
309. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998;81:582-7.
310. Asztalos BF, Horvath KV, McNamara JR, Roheim PS, Rubinstein JJ, Schaefer EJ. Effects of atorvastatin on the HDL subpopulation profile of coronary heart disease patients. *J Lipid Res* 2002;43:1701-7.
311. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-30.
312. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-37.
313. Davignon J. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:267-9.
314. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996;272:685-8.
315. Shimano H, Yamada N, Katsuki M, et al. Plasma lipoprotein metabolism in transgenic mice overexpressing apolipoprotein E. Accelerated clearance of lipoproteins containing apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1992;90:2084-91.
316. Nikoulin IR, Curtiss LK. An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo. *J Clin Invest* 1998;101:223-34.
317. Desurmont C, Caillaud JM, Emmanuel F, et al. Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:435-42.
318. Curtiss LK. ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1852-3.
319. Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:436-41.
320. Utermann G, Beisiegel U. Apolipoprotein A-IV: a protein occurring in human mesenteric lymph chylomicrons and free in plasma. Isolation and quantification. *Eur J Biochem* 1979;99:333-43.
321. Weisgraber KH, Bersot TP, Mahley RW. Isolation and characterization of an apoprotein from the d less than 1.006 lipoproteins of human and canine lymph homologous with the rat A-IV apoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;85:287-92.
322. Rodriguez MD, Kalogeris TJ, Wang XL, Wolf R, Tso P. Rapid synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein A-IV after gastric fat loading in rats. *Am J Physiol* 1997;272:R1170-R1177.
323. Stein O, Stein Y, Lefevre M, Roheim PS. The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1986;878:7-13.
324. Steinmetz A, Barbaras R, Ghalim N, Clavey V, Fruchart JC, Ailhaud G. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *J Biol Chem* 1990;265:7859-63.
325. Steinmetz A, Utermann G. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human

- apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1985;260:2258-64.
326. Duverger N, Tremp G, Caillaud JM, et al. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science* 1996;273:966-8.
327. Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, Van Lenten BJ, Lusis AJ, Reue K. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J Clin Invest* 1997;99:1906-16.
328. Ostos MA, Conconi M, Vergnes L, et al. Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1023-8.
329. Qin X, Swertfeger DK, Zheng S, Hui DY, Tso P. Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *Am J Physiol* 1998;274:H1836-H1840.
330. Kronenberg F, Stuhlinger M, Trenkwalder E, et al. Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:751-7.
331. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994;33:832-9.
332. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993;211:871-9.
333. Tschopp J, Chonn A, Hertig S, French LE. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol* 1993;151:2159-65.
334. Hardardottir I, Kunitake ST, Moser AH, et al. Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and serum concentrations of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters. *J Clin Invest* 1994;94:1304-9.
335. Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:633-45.
336. Wong P, Pineault J, Lakins J, et al. Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J Biol Chem* 1993;268:5021-31.
337. French LE, Wohlwend A, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest* 1994;93:877-84.
338. Fratelli M, Galli G, Minto M, Pasinetti GM. Role of clusterin in cell adhesion during early phases of programmed cell death in P19 embryonic carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1996;1311:71-6.
339. O'Sullivan J, Whyte L, Drake J, Tenniswood M. Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:914-27.
340. Aronow BJ, Lund SD, Brown TL, Harmony JA, Witte DP. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:725-9.
341. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-19.
342. Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, et al. Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:665-72.
343. Miyata M, Biro S, Kaieda H, et al. Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation* 2001;104:1407-12.
344. Millis AJ, Luciani M, McCue HM, Rosenberg ME, Moulson CL. Clusterin regulates vascular smooth muscle cell nodule formation and migration. *J Cell Physiol* 2001;186:210-9.
345. Kiernan UA, Tubbs KA, Nedelkov D, Niederkofler EE, Nelson RW. Detection of novel truncated forms of human serum amyloid A protein in human plasma. *FEBS Lett* 2003;537:166-70.
346. Sellar GC, Jordan SA, Bickmore WA, Fantes JA, van H, V, Whitehead AS. The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: mapping to chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis. *Genomics* 1994;19:221-7.
347. Cabana VG, Siegel JN, Sabesin SM. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1989;30:39-49.
348. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.
349. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 1982;389:39-48.
350. Pizzini C, Mussap M, Plebani M, Fanos V. C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. *Scand J Infect Dis* 2000;32:229-35.
351. Pezzilli R, Melzi d'Eril GV, Morselli-Labate AM, Merlini G, Barakat B, Bosoni T. Serum amyloid A, procalcitonin, and C-reactive protein in early assessment of severity of

- acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1072-8.
352. Pepys MB, Dash AC, Markham RE, Thomas HC, Williams BD, Petrie A. Comparative clinical study of protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum. *Clin Exp Immunol* 1978;32:119-24.
353. Pepys MB, Baltz ML, de Beer FC, et al. Biology of serum amyloid P component. *Ann N Y Acad Sci* 1982;389:286-98.
354. de Beer FC, Baltz ML, Holford S, Feinstein A, Pepys MB. Fibronectin and C4-binding protein are selectively bound by aggregated amyloid P component. *J Exp Med* 1981;154:1134-9.
355. Christner RB, Mortensen RF. Specificity of the binding interaction between human serum amyloid P-component and immobilized human C-reactive protein. *J Biol Chem* 1994;269:9760-6.
356. Ying SC, Gewurz AT, Jiang H, Gewurz H. Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the A chain collagen-like region of C1q. *J Immunol* 1993;150:169-76.
357. Schwalbe RA, Dahlback B, Nelsestuen GL. Independent association of serum amyloid P component, protein S, and complement C4b with complement C4b-binding protein and subsequent association of the complex with membranes. *J Biol Chem* 1990;265:21749-57.
358. Bijl M, Horst G, Bijzet J, Bootsma H, Limburg PC, Kallenberg CG. Serum amyloid P component binds to late apoptotic cells and mediates their uptake by monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum* 2003;48:248-54.
359. Li XA, Hatanaka K, Ishibashi-Ueda H, Yutani C, Yamamoto A. Characterization of serum amyloid P component from human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:252-7.
360. Rattazzi M, Faggini E, Bertipaglia B, Pauletto P. Innate immunity and atherogenesis. *Lupus* 2005;14:747-51.
361. Miyazaki T, Hirokami Y, Matsushashi N, Takatsuka H, Naito M. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J Exp Med* 1999;189:413-22.
362. Kuwata K, Watanabe H, Jiang SY, et al. AIM inhibits apoptosis of T cells and NKT cells in *Corynebacterium*-induced granuloma formation in mice. *Am J Pathol* 2003;162:837-47.
363. Arai S, Shelton JM, Chen M, et al. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpa/Api6 in atherosclerosis development. *Cell Metab* 2005;1:201-13.
364. Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest* 1979;64:1118-29.
365. Lewis JG, Andre CM. Enhancement of human monocyte phagocytic function by alpha 2HS glycoprotein. *Immunology* 1981;42:481-7.
366. Wang H, Zhang M, Bianchi M, Sherry B, Sama A, Tracey KJ. Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14429-34.
367. Yoshioka Y, Gejyo F, Marti T, et al. The complete amino acid sequence of the A-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. *J Biol Chem* 1986;261:1665-76.
368. Gejyo F, Chang JL, Burgi W, et al. Characterization of the B-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. The complete amino acid sequence and primary structure of its heteroglycan. *J Biol Chem* 1983;258:4966-71.
369. Lehtinen AB, Burdon KP, Lewis JP, et al. Association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:345-52.
370. Wang AY, Woo J, Lam CW, et al. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1676-85.
371. Muller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 1988;57:321-47.
372. Shernan SK, Collard CD. Role of the complement system in ischaemic heart disease: potential for pharmacological intervention. *BioDrugs* 2001;15:595-607.
373. Lambris JD, Reid KB, Volanakis JE. The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Immunol Today* 1999;20:207-11.
374. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1386-92.
375. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute

- myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:97-103.
376. Iltumur K, Karabulut A, Toprak G, Toprak N. Complement activation in acute coronary syndromes. *APMIS* 2005;113:167-74.
377. Nijmeijer R, Lagrand WK, Lubbers YT, et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol* 2003;163:269-75.
378. Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M. The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J* 1996;315 (Pt 1):1-9.
379. Akerstrom B, Logdberg L, Berggard T, Osmark P, Lindqvist A. alpha(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:172-84.
380. Tyagi S, Salier JP, Lal SK. The liver-specific human alpha(1)-microglobulin/bikunin precursor (AMBP) is capable of self-association. *Arch Biochem Biophys* 2002;399:66-72.
381. Akerstrom B, Flower DR, Salier JP. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:1-8.
382. McKeehan WL, Sakagami Y, Hoshi H, McKeehan KA. Two apparent human endothelial cell growth factors from human hepatoma cells are tumor-associated proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 1986;261:5378-83.
383. Zhuo L, Yoneda M, Zhao M, et al. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* 2001;276:7693-6.
384. Fries E, Kaczmarczyk A. Inter-alpha-inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochim Pol* 2003;50:735-42.
385. Wakahara K, Kobayashi H, Yagyu T, et al. Bikunin suppresses lipopolysaccharide-induced lethality through down-regulation of tumor necrosis factor- alpha and interleukin-1 beta in macrophages. *J Infect Dis* 2005;191:930-8.
386. Pugia MJ, Valdes R, Jr., Jortani SA. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv Clin Chem* 2007;44:223-45.
387. Hrkál Z, Vodrázka Z, Kalousek I. Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin. *Eur J Biochem* 1974;43:73-8.
388. Camejo G, Halberg C, Manschik-Lundin A, et al. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* 1998;39:755-66.
389. Jeney V, Balla J, Yachie A, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002;100:879-87.
390. Vercellotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:207-13.
391. Smith MA, Hirai K, Hsiao K, et al. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* 1998;70:2212-5.
392. Serdar Z, Serdar A, Altin A, Eryilmaz U, Albayrak S. The relation between oxidant and antioxidant parameters and severity of acute coronary syndromes. *Acta Cardiol* 2007;62:373-80.
393. Cimino M, Gelosa P, Gianella A, Nobili E, Tremoli E, Sironi L. Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. *Neuroscientist* 2007;13:208-13.
394. Kabat EA, Moore DH, Landow H. AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS. *J Clin Invest* 1942;21:571-7.
395. Power DM, Elias NP, Richardson SJ, Mendes J, Soares CM, Santos CR. Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *Gen Comp Endocrinol* 2000;119:241-55.
396. Peterson PA. Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A. *J Biol Chem* 1971;246:44-9.
397. Ingenbleek Y, Young V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr* 1994;14:495-533.
398. Lasztity N, Biro L, Nemeth E, Pap A, Antal M. Protein status in pancreatitis--transthyretin is a sensitive biomarker of malnutrition in acute and chronic pancreatitis. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1320-4.
399. Abraham K, Muller C, Gruters A, Wahn U, Schweigert FJ. Minimal inflammation, acute phase response and avoidance of misclassification of vitamin A and iron status in infants--importance of a high-sensitivity C-reactive protein (CRP) assay. *Int J Vitam Nutr Res* 2003;73:423-30.
400. Gericke B, Raila J, Sehouli J, et al. Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2005;5:133.
401. Rompp A, Dekker L, Taban I, et al. Identification of leptomeningeal metastasis-related proteins in cerebrospinal fluid of patients with breast cancer by a combination

- of MALDI-TOF, MALDI-FTICR and nanoLC-FTICR MS. *Proteomics* 2007;7:474-81.
402. Liu L, Liu J, Dai S, et al. Reduced transthyretin expression in sera of lung cancer. *Cancer Sci* 2007;98:1617-24.
403. Liz MA, Gomes CM, Saraiva MJ, Sousa MM. ApoA-I cleaved by transthyretin has reduced ability to promote cholesterol efflux and increased amyloidogenicity. *J Lipid Res* 2007;48:2385-95.
404. Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:S52-S62.
405. Soprano DR, Blaner W.S. Plasma retinol-binding protein. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. New York: Raven Press, 1994.
406. van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, et al. Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *J Biol Chem* 2001;276:1107-13.
407. Graham TE, Yang Q, Bluher M, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552-63.
408. Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 2007;37:8-17.
409. Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C. Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. *Eur J Biochem* 1986;156:327-33.
410. Holtet TL, Graversen JH, Clemmensen I, Thøgersen HC, Etzerodt M. Tetranectin, a trimeric plasminogen-binding C-type lectin. *Protein Sci* 1997;6:1511-5.
411. Lorentsen RH, Graversen JH, Caterer NR, Thøgersen HC, Etzerodt M. The heparin-binding site in tetranectin is located in the N-terminal region and binding does not involve the carbohydrate recognition domain. *Biochem J* 2000;347 Pt 1:83-7.
412. Caterer NR, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Specificity determinants in the interaction of apolipoprotein(a) kringles with tetranectin and LDL. *Biol Chem* 2002;383:1743-50.
413. Kluft C, Los P, Clemmensen I. Calcium-dependent binding of tetranectin to fibrin. *Thromb Res* 1989;55:233-8.
414. Westergaard UB, Andersen MH, Heegaard CW, Fedosov SN, Petersen TE. Tetranectin binds hepatocyte growth factor and tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 2003;270:1850-4.
415. Kamper EF, Kopeikina L, Mantas A, Stefanadis C, Toutouzas P, Stavridis J. Tetranectin levels in patients with acute myocardial infarction and their alterations during thrombolytic treatment. *Ann Clin Biochem* 1998;35 (Pt 3):400-7.
416. Krysiak R, Okopien B, Herman Z. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. *Drugs* 2003;63:1821-54.
417. White P, Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:320-7.
418. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* 1989;10:294-307.
419. Piquette CA, Robinson-Hill R, Webster RO. Human monocyte chemotaxis to complement-derived chemotaxins is enhanced by Gc-globulin. *J Leukoc Biol* 1994;55:349-54.
420. Yamamoto N, Homma S, Millman I. Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. Role of vitamin D3-binding protein (group specific component, Gc) in lysophospholipid activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1991;147:273-80.
421. Gumireddy K, Reddy CD, Swamy N. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates DBP-maf-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 2003;90:87-96.
422. Haddad JG. Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:579-82.
423. Rubenstein PA, Spudich JA. Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:120-3.
424. Vandekerckhove J, Weber K. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J Mol Biol* 1984;179:391-413.
425. Korn ED. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev* 1982;62:672-737.
426. Mejean C, Roustan C, Benyamin Y. Anti-actin antibodies. Detection and quantitation of total and skeletal muscle actin in human plasma using a competitive ELISA. *J Immunol Methods* 1987;99:129-35.
427. Lee WM, Reines D, Watt GH, et al. Alterations in Gc levels and complexing in septic shock. *Circ Shock* 1989;28:249-55.
428. Dahl B. The extracellular actin scavenger system in trauma and major surgery. Clinical and experimental studies. *Acta Orthop Suppl* 2005;76:2-24.

429. Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Role of plasma gelsolin and the vitamin D-binding protein in clearing actin from the circulation. *J Clin Invest* 1986;78:736-42.
430. Harper KD, McLeod JF, Kowalski MA, Haddad JG. Vitamin D binding protein sequesters monomeric actin in the circulation of the rat. *J Clin Invest* 1987;79:1365-70.
431. Goldschmidt-Clermont PJ, Van BH, Bouillon R, et al. Role of group-specific component (vitamin D binding protein) in clearance of actin from the circulation in the rabbit. *J Clin Invest* 1988;81:1519-27.
432. Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1381-5.
433. Harris DA, Schwartz JH. Characterization of brevin, a serum protein that shortens actin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:6798-802.
434. Janmey PA, Chaponnier C, Lind SE, Zaner KS, Stossel TP, Yin HL. Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. *Biochemistry* 1985;24:3714-23.
435. Dahl B, Schiodt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock* 1999;12:102-4.
436. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem* 2006;52:1247-53.
437. Norberg R, Thorstensson R, Utter G, Fagraeus A. F-Actin-depolymerizing activity of human serum. *Eur J Biochem* 1979;100:575-83.
438. Nishida E, Kuwaki T, Maekawa S, Sakai H. A new regulatory protein that affects the state of actin polymerization. *J Biochem (Tokyo)* 1981;89:1655-8.
439. Coue M, Korn ED. Interaction of plasma gelsolin with G-actin and F-actin in the presence and absence of calcium ions. *J Biol Chem* 1985;260:15033-41.
440. Coue M, Korn ED. ATP hydrolysis by the gelsolin-actin complex and at the pointed ends of gelsolin-capped filaments. *J Biol Chem* 1986;261:1588-93.
441. Weber A, Pring M, Lin SL, Bryan J. Role of the N- and C-terminal actin-binding domains of gelsolin in barbed filament end capping. *Biochemistry* 1991;30:9327-34.
442. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med* 1992;326:1335-41.
443. Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Depression of gelsolin levels and detection of gelsolin-actin complexes in plasma of patients with acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:429-34.
444. Ito H, Kambe H, Kimura Y, et al. Depression of plasma gelsolin level during acute liver injury. *Gastroenterology* 1992;102:1686-92.
445. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Crit Care Med* 1997;25:594-8.
446. Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, Dinubile MJ. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1673-81.
447. Rothenbach PA, Dahl B, Schwartz JJ, et al. Recombinant plasma gelsolin infusion attenuates burn-induced pulmonary microvascular dysfunction. *J Appl Physiol* 2004;96:25-31.
448. Macleod AR. Genetic origin of diversity of human cytoskeletal tropomyosins. *Bioessays* 1987;6:208-12.
449. Wolska BM, Wicczorek DM. The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation. *Pflugers Arch* 2003;446:1-8.
450. Marston SB, Smith CW. The thin filaments of smooth muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 1985;6:669-708.
451. Onji T, Takagi M, Uodome N, Shibata N, Aoki K. Tropomyosin-caldesmon/actomyosin systems in platelets and arterial smooth muscle: results from exchange experiments. *Biochim Biophys Acta* 1989;999:248-53.
452. Schevzov G, Vrhovski B, Bryce NS, et al. Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *J Histochem Cytochem* 2005;53:557-70.
453. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995;75:487-517.
454. Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, et al. Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. *Biochemical and morphologic studies. Lab Invest* 1991;65:459-70.
455. Abouhamed M, Reichenberg S, Robenek H, Plenz G. Tropomyosin 4 expression is enhanced in dedifferentiating smooth muscle cells in vitro and during atherogenesis. *Eur J Cell Biol* 2003;82:473-82.
456. Campbell DJ, Bouhnik J, Coezy E, Menard J, Corvol P. Characterization of precursor and secreted forms of human angiotensinogen. *J Clin Invest* 1985;75:1880-93.

457. Ribeiro AB, Kohlmann O, Jr., Saragoca MA, Marson O, Ramos OL. The renin-angiotensin system in the control of systemic arterial pressure. *Drugs* 1985;30 Suppl 1:6-12.
458. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988;77:14-13.
459. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation* 1993;87:IV7-13.
460. Corvol P, Lamande N, Cruz A, Celerier J, Gasc JM. Inhibition of angiogenesis: a new function for angiotensinogen and des(angiotensin I)angiotensinogen. *Curr Hypertens Rep* 2003;5:149-54.
461. Glorioso N, Troffa C, Filigheddu F, et al. Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension* 1999;34:1281-6.
462. Dechend R, Fiebeler A, Park JK, et al. Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Circulation* 2001;104:576-81.
463. Yae Y, Inaba S, Sato H, Okochi K, Tokunaga F, Iwanaga S. Isolation and characterization of a thermolabile beta-2 macroglycoprotein ('thermolabile substance' or 'Hakata antigen') detected by precipitating (auto) antibody in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Biochim Biophys Acta* 1991;1078:369-76.
464. Sugimoto R, Yae Y, Akaiwa M, et al. Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J Biol Chem* 1998;273:20721-7.
465. Matsushita M, Kuraya M, Hamasaki N, Tsujimura M, Shiraki H, Fujita T. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol* 2002;168:3502-6.
466. Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleton P, Garred P. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* 2007;56:1598-607.
467. Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WG. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci* 1994;3:810-21.
468. Schneider AS. Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:119-40.
469. Eber SW, Pekrun A, Bardosi A, et al. Triosephosphate isomerase deficiency: haemolytic anaemia, myopathy with altered mitochondria and mental retardation due to a new variant with accelerated enzyme catabolism and diminished specific activity. *Eur J Pediatr* 1991;150:761-6.

Anexo

Lo que importa es cuanto amor ponemos en el trabajo que realizamos.
Teresa de Calcuta

Trabajos publicados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

1. Barderas MG, Duran MC, **Darde VM**, Lázaro A, Gallego-Delgado J, De la Cuesta F, Martin-Ventura JL, Jimenez-Nacher JJ, Tuñón J., Lopez-Bescos L, Egido J, and Vivanco F (2005) Expresión diferencial de proteínas de monocitos circulantes en el síndrome coronario agudo mediante análisis proteómico. *Investigación Cardiovascular*, 8, 43-56.
2. Vivanco F, Martin-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco-Colio L, **Darde VM**, Mas S, Meilhac O, Michel JB, Tunon J, and Egido J (2005) Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Proteome Res*, 4, 1181-1191.
3. **Darde VM**, Barderas MG, De la Cuesta F, Durán MC, Egido J, and Vivanco F (2006) La depleción de las proteínas mayoritarias del plasma facilita su análisis proteómico en pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación Cardiovascular*, 9, 37-54.
4. Vivanco F, **Darde VM**, De la Cuesta F, and Barderas MG (2006) Cardiovascular Proteomics. *Current Proteomics*, 3, 147-170.
5. Duran MC, Martin-Ventura JL, Mas S, Barderas MG, **Darde VM**, Jensen ON, Egido J, and Vivanco F (2007) Characterization of the human atheroma plaque secretome by proteomic analysis. *Methods Mol Biol*, 357, 141-150.
6. Barderas MG, **Darde VM**, Duran MC, Egido J, and Vivanco F (2007) Characterization of circulating human monocytes by proteomic analysis. *Methods Mol Biol*, 357, 319-328.
7. **Darde VM**, Barderas MG, and Vivanco F (2007) Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis. *Methods Mol Biol*, 357, 351-364.
8. Barderas MG, Tunon J, **Darde VM**, De la Cuesta F, Duran MC, Jimenez-Nacher JJ, Tarin N, Lopez-Bescos L, Egido J, and Vivanco F (2007) Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile. *J Proteome Res*, 6, 876-886.

9. Vivanco F, Mas S, **Darde VM**, De la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, and Barderas MG (2007) Vascular proteomics. *Proteomics Clin Appl*, 1, 1102-1122.
10. Vivanco F, Padial LR, **Darde VM**, De la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Diaz-Prieto N, and Barderas MG (2007) Proteomic biomarkers of atherosclerosis. *Biomarkers Insights*, (en revisión).
11. Barderas MG, Tuñón J, **Darde VM**, De la Cuesta F, Duran MC, Lazaro A, Gallego-Delgado J, Jimenez-Nacher JJ, Tarin N, Lopez-Bescos L, Egido J, and Vivanco F (2007) Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics Clin Appl*, (en revisión).